UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)
SOROK. E *Beauveria bassiana* (BALS.)VUILL. PARA O
CONTROLE DE PRAGAS DE GRÃOS ARMAZENADOS

ALCIDES MOINO JUNIOR

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATIST AALVES

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1993

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

M172u Moino Junior, Alcides
Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o
controle de pragas de grãos armazenados. Piraci-
caba, 1993.
100p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Fungo para controle bio-
lógico 3. Grão armazenado - Praga - Controle biológico 4. Praga agrícola - Controle biológico 1. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 631.563
589.2

UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E
Beauveria bassiana (BALS.) VUILL. PARA O CONTROLE
DE PRAGAS DE GRÃOS ARMAZENADOS

Alcides Moino Junior

Aprovada em: 03/02/94

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Djair Vendramim	ESALQ/USP
Dra. Ivânia Athié Pacheco	ITAL

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves
Orientador

"Toda descoberta científica inclui
uma pressuposição ideológica e uma
conseqüência social prática."

W. Reich

Aos meus pais Alcides e Alice,
pela minha formação humana e
profissional

DEDICO

A Andréa, pela alegria
do presente e esperança
no futuro

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que existe acima de todo conhecimento do ser humano.

Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor Associado do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pelo apoio, confiança e amizade na orientação deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), pelos ensinamentos valiosos e atenção dispensada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, pelos bons momentos e experiências que pudemos compartilhar no decorrer do curso.

À Bióloga Solange Aparecida Vieira, pela ajuda na condução dos experimentos e conhecimentos

transmitidos ao longo de nossa convivência.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, em especial a Heraldo Negri de Oliveira, Regina Célia B. de Moraes e Cícera de Carvalho Sabino, pela valiosa colaboração.

Às bibliotecárias Kátia Maria de Andrade Ferraz e Eliana Maria Garcia Sabino, pelo auxílio na correção das referências e à funcionária Luzia Fátima Santos Possato, do Setor de Circulação e Empréstimo (DIBD/ESALQ), pela atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Evôneo Berti Filho, pela elaboração do Summary.

Aos amigos Yuri Tavares Rocha, Luís F. A. Alves, Amarildo Pasini, Fernando L. Cònsoli, Teresinha A. Giustolin, Silvia M. Gomes, Maurício U. Ventura, José Eduardo M. de Almeida, Paulo Henrique S. da Silva, Nelson A. C. Daza, José Baldin Pinheiro, Maria Cristina Falco e Antonio Augusto F. Garcia, pelo apoio e amizade de sempre.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Importância e danos causados por pragas de grãos armazenados	3
2.2 - Controle de pragas de grãos armazenados	8
2.2.1 - Controle químico	8
2.2.2 - Métodos físicos e medidas de higiene	12
2.2.3 - Resistência de grãos armazenados a insetos	15
2.2.4 - Controle biológico	16
2.2.4.1 - Predadores e parasitóides	18
2.2.4.2 - Protozoários, vírus e bactérias	20
2.2.4.3 - Fungos entomopatogênicos	27
3 - MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 - Criação e manutenção dos insetos	37
3.2 - Obtenção dos isolados dos fungos	38
3.3 - Seleção dos isolados mais virulentos	41
3.4 - Avaliação da eficiência dos isolados selecionados no "screening"	47

3.4.1 - Estabelecimento da dosagem padrão . . .	47
3.4.2 - Bioensaios com os isolados selecionados	48
3.5 - Estudos de dosagens a serem aplicadas sobre os grãos	49
3.6 - Estudos de aplicação dos conídios em formulações	54
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 - Seleção dos isolados mais virulentos	56
4.2 - Avaliação da eficiência dos isolados selecionados no "screening"	62
4.2.1 - Estabelecimento da dosagem padrão . . .	62
4.2.2 - Bioensaios com os isolados selecionados	63
4.3 - Estudos de dosagens a serem aplicadas nos grãos	66
4.4 - Estudos de aplicação do fungo em formulações	77
5 - CONCLUSÕES	80
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

página

- Figura 1. Inoculação dos insetos nas placas de Petri visando oferecer um alto potencial de inóculo (primeira fase de seleção). 43
- Figura 2. Placa plástica com orifícios para individualização dos insetos utilizada para a confirmação da mortalidade causada pelos patógenos. 45
- Figura 3. Câmara úmida composta de recipiente plástico hermético e espuma umedecida utilizada para a confirmação da mortalidade causada pelos patógenos. 46
- Figura 4. Distribuição dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em faixas de porcentagem de mortalidade obtidas sobre as três pragas estudadas. 61
- Figura 5. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. oryzae* em grãos inoculados com os isolados 476 e 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens estudadas. 70
- Figura 6. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. zeamais* em grãos inoculados com os isolados 476 e 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens estudadas. 73
- Figura 7. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *R. dominica* em grãos inoculados com os isolados 476 e 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens estudadas. 76

LISTA DE TABELAS

página

- Tabela 1. Procedência e hospedeiros dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizados nos testes com *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica*. 40
- Tabela 2. Porcentagem de mortalidade total confirmada de *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica* após 10 dias de inoculação com isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). . 59
- Tabela 3. Valores de DL90 dos isolados estudados e equações obtidas pela análise de Probit no estabelecimento da dosagem padrão (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). 62
- Tabela 4. Porcentagens médias de mortalidade após dez dias e valores de TL₅₀ para *S. oryzae* quando inoculado com *B. bassiana* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). . 63
- Tabela 5. Porcentagens médias de mortalidade após dez dias e valores de TL₅₀ para *S. zeamais* quando inoculado com *B. bassiana* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). . 64
- Tabela 6. Porcentagens médias de mortalidade após dez dias e valores de TL₅₀ para *R. dominica* quando inoculado com *B. bassiana* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). . 65
- Tabela 7. Valores de DL₅₀ e equações obtidas pela análise de Probit para o fungo *B. bassiana*, isolados 476 e 604, sobre as três pragas estudadas (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). 66

- Tabela 8. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. oryzae* quando inoculados com o isolado 476 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). 68
- Tabela 9. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. oryzae* quando inoculados com o isolado 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). 68
- Tabela 10. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. zeamais* quando inoculados com o isolado 476 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). .71
- Tabela 11. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. zeamais* quando inoculados com o isolado 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). .71
- Tabela 12. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *R. dominica* quando inoculados com o isolado 476 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). .74
- Tabela 13. Porcentagens de mortalidade de adultos de *R. dominica* quando inoculados com o isolado 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas). .74
- Tabela 14. Porcentagens de mortalidade total confirmada de *S. oryzae* aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação do fungo *B. bassiana* em diferentes formulações (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).78

UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)SOROK. E
Beauveria bassiana (BALS.)VUILL. PARA O CONTROLE DE
PRAGAS DE GRÃOS ARMAZENADOS

Autor: Alcides Moino Junior

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

RESUMO

Determinou-se a patogenicidade de isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorok. sobre *Sitophilus oryzae* (L., 1763), *S. zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera, Curculionidae) e *Rhyzopertha dominica* (Fabr., 1792) (Coleoptera, Bostrichidae). Foi realizado um "screening" com 72 isolados das duas espécies de fungos que permitiu a seleção de dois isolados de *B. bassiana* mais virulentos às pragas estudadas. Foram determinadas, em seguida, as dosagens necessárias para aplicação do patógeno nos grãos, bem como estudos de aplicação dos conídios formulados com diferentes inertes. Existe uma grande variabilidade na patogenicidade dos isolados testados. As três pragas são suscetíveis a *B.*

bassiana e *M. anisopliae*, sendo os isolados da primeira espécie de fungo mais eficazes que os da segunda. A espécie *R. dominica* é a mais suscetível aos patógenos testados. A adição de diferentes inertes aos conídios de *B. bassiana* não favorece a eficácia do patógeno para o controle de *S. oryzae* quando comparados com o fungo puro.

UTILIZATION OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)SOROK. AND
Beauveria bassiana (BALS.)VUILL. FOR THE CONTROL OF
STORED GRAIN PESTS

Author: Alcides Moino Junior

Adviser: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

SUMMARY

The pathogenicity of isolates of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorok. on *Sitophilus oryzae* (L., 1763), *S. zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Fabr., 1792) (Coleoptera, Bostrichidae) was evaluated. Further studies were carried out to determine the appropriate dosages for pathogen application on the grains, and to evaluate the efficacy of conidia formulated with different inerts. There is a high variability among the isolates tested. The fungus *B. bassiana* is more efficient than *M. anisopliae*. *R. dominica* is the most susceptible species to the fungi tested. The addition of different inerts to *B. bassiana* conidia did not increase

the efficacy of the pathogen on the control of *S. oryzae* when compared to the pure fungus (conidia).

1 - INTRODUÇÃO

Os grãos armazenados são atacados por pragas que causam sérios prejuízos. Segundo GALLO et al. (1988), citando dados da FAO, as perdas mundiais são estimadas em 10% da produção total de grãos.

No Brasil, as perdas ocorridas na colheita e armazenamento de milho, soja, arroz, trigo e feijão, na safra de 91/92 foram de cerca de 20 %, de acordo com estimativas do IEA de São Paulo. Sendo assim, todos os esforços concentrados no aumento da produção de grãos podem não dar resultados, se não houver conseqüente melhoria das condições de armazenamento e controle das pragas desses produtos.

A utilização contínua de defensivos químicos para o controle dessas pragas vem causando problemas como o surgimento de resistência a esses produtos (PACHECO et al., 1990; SARTORI et al., 1990). Além disso, outros inconvenientes do uso de defensivos químicos, como contaminação do ambiente, intoxicação de animais domésticos e do homem e ocorrência de resíduos tóxicos nos grãos, levam à necessidade de pesquisas com outros métodos de

controle dessas pragas, dentre os quais se destaca o controle biológico por meio de entomopatógenos. Esse método, sem dúvida, é o que mais se aproxima do controle químico, sem os inconvenientes deste último.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo determinar a patogenicidade de isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorok. sobre as espécies *Sitophilus oryzae* (L., 1763), *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae) e *Rhyzopertha dominica* (Fabr.,1762) (Col.:Bostrichidae), importantes pragas de grãos armazenados, com a realização de estudos de dosagens e formulações que permitam a aplicação como agentes de controle microbiano no armazenamento de grãos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Importância e danos causados por pragas de grãos armazenados

Os insetos pragas de grãos armazenados possuem características peculiares que justificam sua importância e o tratamento diferenciado que se deve impor no manejo destas pragas. De maneira geral, caracterizam-se por um elevado potencial biótico, pela possibilidade de ocorrência de infestação cruzada e pela capacidade de atacar e danificar um grande número de hospedeiros (GALLO et al., 1988).

Os insetos que atacam grãos armazenados pertencem às ordens Coleoptera e Lepidoptera. Os coleópteros, na sua maioria, têm a forma adulta bem resistente, devido à presença dos élitros. São de dimensões reduzidas, o que facilita sua movimentação ao longo da massa de grãos, permitindo sua ocorrência em grandes profundidades. Por outro lado, os lepidópteros são mais frágeis, e de tamanho maior, permanecendo nas camadas superficiais da massa de grãos, onde concentram suas

atividades, como alimentação e oviposição (PUZZI, 1986).

De acordo com ROSSETTO (1966), no Brasil os insetos de maior importância para os grãos armazenados são *S. zeamais*; *Sitotroga cerealella* (Oliver)(Lepidoptera, Pyralidae); *Araecerus fasciculatus* (De Geer)(Coleoptera, Anthribidae); *Zabrotes subfasciatus* Boh.(Coleoptera, Bruchidae); *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera, Bruchidae); *S. oryzae* e *Plodia interpunctella* (Huebner) (Lepidoptera, Pyralidae). Mais recentemente houve a introdução de *R. dominica* e devido a problemas com o surgimento de populações resistentes ao inseticida malation e principalmente ao fumigante fosfina (SARTORI et al., 1990; PACHECO et al., 1990), é atualmente uma das principais pragas de grãos armazenados.

Com finalidade didática, pode-se considerar que existem dois grupos principais de pragas de grãos armazenados: as pragas primárias, que são aquelas que possuem a capacidade de se alimentar de grãos íntegros e sadios, e as pragas secundárias, que só conseguem se alimentar de grãos previamente danificados por insetos primários, partidos ou que apresentem defeitos na casca ou infecção por microrganismos, além de infestar os subprodutos dos grãos, como farinhas, farelos, fubás e rações. Um terceiro grupo de insetos, de menor importância, é o dos insetos associados, que não atacam os grãos,

utilizando-os apenas como substrato, alimentando-se de detritos e fungos. Neste grupo, embora não sejam insetos, pode-se incluir os ácaros de produtos armazenados, muito comuns, principalmente em massas de grãos já infestadas por insetos ou contaminadas por microrganismos (GALLO et al., 1988; PUZZI, 1986).

Estas pragas levam a perdas quantitativas e qualitativas nos lotes de grãos armazenados. Os danos quantitativos caracterizam-se pela perda de peso nos lotes, devido à alimentação dos insetos. Alguns trabalhos determinaram os danos quantitativos provocados por estes insetos, como os de BITRAN & MELLO (1972) e CAMPOS & BITRAN (1976), onde se observou que as perdas causadas em milho armazenado pelo gorgulho *S. zeamais* foram de 50 a 80% após 6 meses de armazenamento, e de 19,1 e 33,3% com 75 e 95% de infestação após 150 dias, respectivamente.

Os danos qualitativos caracterizam-se por alterações na qualidade dos produtos, como diminuição do valor nutritivo, desvalorização comercial, poluição da massa de grãos e perda das propriedades industriais (panificação, massas, etc.). Além dos danos quantitativos e qualitativos, pode-se considerar, à parte, os danos causados às sementes, que podem sofrer a destruição do embrião, com conseqüente diminuição do poder germinativo do lote. As pragas de grãos armazenados estão sujeitas a

fatores ecológicos que são responsáveis pela distribuição e regulação de suas populações no ambiente de armazenamento. Essas pragas se desenvolvem, de maneira geral, numa faixa ótima de temperatura entre 27 e 35°C, sendo valores acima de 35°C geralmente letais, e abaixo de 23°C, redutores do potencial biótico das mesmas. A umidade da massa de grãos entre 12 e 15% favorece o desenvolvimento da maioria das pragas, sendo que valores abaixo de 10% inviabilizam a sua ocorrência. Teores de umidade acima de 15% também são desfavoráveis aos insetos, sendo porém, fator importante para o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos indesejáveis, principalmente fungos (GALLO et al., 1988). A interação desses fatores ecológicos é muito importante para o controle dessas pragas. Pode-se dizer que o ambiente de armazenamento, por ser uniforme e estável, é muito favorável para esses insetos. Além disso, esse ambiente deve ser considerado um ecossistema típico.

DUNKEL (1992) propõe que o manejo do ecossistema de grãos armazenados se baseie nos mesmos princípios que são usados para estudar e manejar outros ecossistemas, considerando os elementos biológicos (incluindo a sociedade humana), os elementos físicos (definidos pela estrutura do ecossistema) e, principalmente, as interrelações entre esses elementos. O autor considera o ecossistema de grãos armazenados como um

sistema que utiliza a energia solar e é subsidiado pelo homem. Assim, esse ecossistema pode ser caracterizado como uma sucessão ecológica, onde deve-se considerar: 1) a diversidade de espécies; 2) o modo como cada espécie se desenvolve; 3) a dominância existente; 4) a abundância relativa das espécies e 5) a estrutura trófica que caracteriza o sistema. As comunidades que constituem o sistema são a comunidade fúngica, a comunidade de insetos e a comunidade de mamíferos (incluindo o homem) e aves que se alimentam dos grãos ou seus subprodutos, sendo assim os usuários finais.

Nessa abrangência teórica, o autor considera muito importante o nível político, e aqui se encaixa o problema das perdas em armazenamento que tanto afetam os grãos armazenados no sistema de estocagem do Brasil. Numa perspectiva para pesquisas futuras, ressalta-se o crescimento proporcional de indivíduos resistentes nas populações de insetos e ácaros, o que deve intensificar as buscas por métodos alternativos de manejo. Essas alternativas devem usar recursos renováveis, que não poluam o ambiente, e não promovam o desenvolvimento de populações de pragas resistentes (DUNKEL,1992).

2.2 - Controle de pragas de grãos armazenados

O controle de pragas de grãos armazenados vem sendo feito, basicamente, com o emprego de produtos químicos. Porém, outros métodos preventivos, conduzidos antes e durante o período de armazenamento também são importantes para o controle eficiente dessas pragas. Além disso, métodos alternativos ao uso do controle químico podem oferecer boas perspectivas de diminuição de problemas como contaminação do ambiente, presença de resíduos nos grãos e surgimento de populações de pragas resistentes.

2.2.1 - Controle químico

O controle químico de pragas de grãos armazenados é baseado na utilização de fumigantes, pela operação conhecida como fumigação ou expurgo, bem como em aplicações de inseticidas em pó ou por via líquida, para evitar o surgimento de reinfestações. Os fumigantes atuam sobre o sistema respiratório dos insetos, que absorvem os gases tóxicos exalados durante a operação. Nesse processo utiliza-se a fosfina ou o brometo de metila, sendo que este último deve ser evitado no tratamento de sementes, por inibir a germinação das mesmas. A operação de fumigação

pode ser realizada em produtos armazenados a granel ou ensacados, ou mesmo em paióis, onde o milho, no caso, é armazenado em palha. Devem ser tomados, em todos os casos, cuidados especiais para impedir vazamento de gases, o que, além da diminuição da eficiência da operação, pode provocar intoxicações e a morte do homem e animais domésticos. No Brasil, de acordo com a legislação, é permitido o tratamento de grãos com inseticidas formulados em pó utilizando-se o organofosforado malation e o piretróide deltametrina. Para maior eficiência do tratamento, o produto deve ser bem misturado aos grãos, sendo geralmente indicado para pequenas quantidades (GALLO et al., 1988). O tratamento de grãos com formulações líquidas tem sido realizado com o uso do piretróide deltametrina e dos organofosforados malation, pirimifós metílico, fenitrotion e diclorvós, que são geralmente aplicados em pulverização na correia transportadora ou sobre o produto ensacado. O uso desses inseticidas e fumigantes deve obedecer à legislação, a qual especifica os produtos em que podem ser aplicados, o resíduo permitido e o período de carência.

Outras substâncias podem ser utilizadas para o controle dessas pragas, como o ácido sórbico. DUNKEL & READ (1986) testaram o ácido sórbico como protetor do milho armazenado por um período de 15 meses. O produto foi eficiente para o controle de *S. oryzae* e *Tribolium confusum*

Jaquelin Du Val. A germinação dos grãos não foi afetada nos 3 primeiros meses, parecendo haver problemas após os 15 meses de tratamento, mas em pequeno grau. Foram detectadas diferenças na presença de insetos predadores e parasitóides das pragas nas parcelas tratadas e não tratadas, indicando um possível efeito sobre esses inimigos naturais.

Nos últimos anos, novos grupos de inseticidas, conhecidos como fisiológicos, têm se mostrado eficientes e seguros para o controle de diversas pragas, e podem também o ser para pragas de grãos armazenados, por serem menos tóxicos ao ambiente e mais seletivos aos inimigos naturais. O controle químico preventivo das pragas de grãos armazenados, quando realizado criteriosamente, é de eficiência comprovada. Por outro lado, casos de resistência de populações destas pragas vêm sendo relatados com certa freqüência, devido principalmente, a aplicações em dosagens inadequadas, ou utilização do mesmo produto por um longo período de tempo.

Já em 1972/73, em um levantamento realizado pela FAO, CHAMP & DYTE (1976) detectaram a ocorrência de populações de pragas de grãos armazenados resistentes ao malathion em 78 dos 86 países amostrados, envolvendo 637 de um total de 1027 populações coletadas. Com relação à fosfina, foram detectadas 82 populações resistentes, entre 849 testadas, abrangendo 33 dos 82 países amostrados.

No Brasil, PACHECO *et al.* (1990) realizaram amostragens em unidades armazenadoras localizadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo, coletando populações de pragas, com a finalidade de detectar a ocorrência de resistência à fosfina. Foram testadas 12 populações de *S. oryzae*, 2 de *S. zeamais*, 10 de *R. dominica*, 10 de *Tribolium castaneum* Herbst e 8 de *Cryptolestes* spp., sendo encontradas respectivamente, 12, 0, 9, 9 e 8 populações resistentes ao fumigante.

SARTORI *et al.* (1990), realizando levantamento semelhante, procuraram detectar populações resistentes ao malation. Das 14 populações testadas de *S. oryzae*, 12 de *R. dominica* e 15 de *T. castaneum*, foram encontradas, respectivamente 11, 11 e 15 populações resistentes.

A ocorrência de populações de insetos pragas de grãos armazenados resistentes aos inseticidas mais comumente usados para o seu controle é um importante indicativo da necessidade da busca de alternativas viáveis e eficientes para o controle dessas pragas.

2.2.2 - Métodos físicos e medidas de higiene

Segundo MUNRO (1966), os principais métodos físicos de controle são o uso de temperaturas altas e/ou baixas, o armazenamento hermético e a irradiação por raios gama ou elétrons.

Com relação ao uso da radiação, WALDER (1974) estudou os efeitos das radiações gama, provenientes de uma fonte de Cobalto-60, sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr.). Foi calculada uma dose esterilizante para adultos de 8 Krad e uma dose letal ao redor de 330 Krad, verificando-se ainda diminuição da capacidade de postura, aumento da longevidade das fêmeas e diminuição da longevidade dos machos, quando submetidos à radiação. DOMARCO (1977) estudou os efeitos da radiação gama sobre *S. oryzae*, *S. zeamais*, *R. dominica* e *Z. subfasciatus*, detectando diferentes efeitos sobre a sobrevivência dos insetos, conforme a taxa de radiação utilizada, e, de maneira geral, grande influência na reprodução. Também, trabalhando com *Z. subfasciatus*, ARTHUR (1981) verificou a influência da temperatura na eficiência do tratamento com radiação, sendo que o frio antes da radiação possui efeito protetor, além de diminuir o número de insetos nascidos na primeira geração. SILVA et al. (1991) determinaram os efeitos da radiação gama na viabilidade de ovos de *Anagasta*

kuehniella (Zeller) (Lep.: Pyralidae) com diferentes idades, constatando que a dose letal para ovos de 24 e 48 horas foi de 65 Gy, e para ovos de 72 horas foi de 90 Gy.

A utilização de feromônios sintéticos, de acordo com WAIB (1992), pode também ser incluída nessa categoria, embora esteja relacionada a um mecanismo químico de comunicação entre indivíduos de uma determinada espécie. Todavia, os feromônios servem como fonte de atração dos insetos a outros tipos de armadilhas, ou áreas tratadas com inseticidas, daí sua inclusão como método físico. Dessa forma, TREMATERRA & GIRGENTI (1989) estudaram as propriedades atrativas do feromônio sintético (4S, 5R)-sitofinona a *S. oryzae* em laboratório e no armazém. Houve um forte efeito sinérgico entre o feromônio e os diversos alimentos utilizados nos testes, como milho quebrado e arroz. SALGADO & FAVERO (1993) estudaram a atratividade do feromônio sintético de agregação sitofilure a machos e fêmeas virgens de *S. zeamais* por meio de um olfatômetro, em doses de 0,01 a 1,00 micrograma/50 ml. Houve maior atração dos machos que das fêmeas, não havendo respostas quanto às doses testadas. Também FAVERO et al. (1993) testaram esse feromônio em câmaras de dupla escolha, nas mesmas doses do estudo anterior, verificando que o efeito atraente do feromônio permanece até 60 minutos (51% de resposta) após a liberação dos insetos, decrescendo em

seguida até atingir um índice de resposta de 14 %.

Segundo BANKS et al. (1990), o uso de técnicas de armazenamento por meio de atmosfera controlada tem sido pesquisado e utilizado já por duas décadas, constituindo importante papel em sistemas integrados de proteção de grãos, principalmente quando se exige tratamentos que não deixem resíduos.

As medidas de higiene são tarefas auxiliares, que complementam os métodos de controle de pragas de grãos armazenados. GALLO et al. (1988) destacam a preparação do local antes do armazenamento, sendo que o depósito deve impedir a entrada de pássaros e roedores; deve-se limpar os resíduos de colheitas anteriores; não misturar colheitas novas e velhas; limpar periodicamente o depósito e arredores. Completando-se essas medidas, recomenda-se o uso do controle químico pulverizando paredes, teto, piso, portas, estrados e desinfetando periodicamente veículos de transporte e maquinarias. O expurgo deve ser realizado imediatamente após a colocação dos grãos no depósito e a sacaria usada vazia também deve ser fumigada. Por fim, deve-se realizar inspeções periódicas a cada 15 dias para evitar a infestação e avaliar a necessidade de tratamentos posteriores com pesticidas.

2.2.3 - Resistência de grãos armazenados a insetos

A utilização da resistência de plantas a insetos como método de controle de pragas pode ser considerada como ideal, pois não traz custos adicionais ao produtor, além de evitar o uso de produtos químicos, ou pelo menos promover a diminuição das doses e do número de aplicações necessárias. Com relação a pragas de grãos armazenados, alguns casos foram bem estudados, resultando em aplicações práticas viáveis.

LINK *et al.* (1971) estudaram a obtenção de variedades de arroz em casca resistentes a *S. oryzae*, *S. zeamais* e *S. cerealella*. A maioria das variedades foi considerada moderadamente suscetível, sendo cerca de 30% resistentes. As mais infestadas foram aquelas com maiores porcentagens de ocorrência de fenda lateral na casca. LINK & ROSSETTO (1972), estudando grãos de arroz que apresentavam uma abertura entre a pálea e a lema, e grãos de casca fechada, concluíram que o principal fator que regula a suscetibilidade dos grãos a *S. cerealella* é a abertura da casca.

ROSSETTO *et al.* (1973) verificaram o comportamento de 1700 variedades de arroz em casca de vários países, com relação à infestação de *S. zeamais*. Não

se verificou infestação em grãos com casca sadia e bem fechada, sendo as de casca quebrada as mais danificadas (7% das variedades). A separação entre a lema e a pálea também permitiu severa infestação em 8.7% das variedades. Segundo os autores, lema e pálea separadas e facilidade de descascamento são caracteres recessivos simples, devendo ser trabalhados no melhoramento do arroz para resistência a *Sitophilus* spp.

Com relação à resistência do caupi ao *C. maculatus*, ARAÚJO & WATT (1988) relataram que os primeiros trabalhos sobre o assunto indicavam a ocorrência de não-preferência para postura e antibiose, ao se avaliar o número de adultos emergidos e o alongamento do ciclo do inseto. No entanto, os autores supõem que a principal causa da resistência seja a existência de fatores inibidores de tripsina, parcialmente associados a outras características (físicas, morfológicas, etc.), havendo efeito deterrente dessa substância sobre a postura do inseto.

2.2.4 - Controle biológico

O controle biológico, assim como é definido por DE BACH (1964), consiste da ação de inimigos naturais (parasitóides, predadores e patógenos) na manutenção de uma densidade baixa de determinada população. O controle

biológico pode ser natural, ocorrendo sem a intervenção do homem, ou aplicado, quando o homem introduz inimigos naturais com a finalidade de controlar determinada praga (VAN DEN BOSCH *et al.*, 1982).

Diversos fatores bióticos e abióticos interferem na eficiência de um inimigo natural, e deste fato decorrem as vantagens e desvantagens do emprego deste método de controle. É importante ressaltar que o controle biológico é parte essencial de um programa de Manejo Integrado de Pragas, não se caracterizando como medida de controle isolada.

Com relação ao controle de pragas de grãos armazenados, poucos são os exemplos de emprego de inimigos naturais com esta finalidade, sendo os trabalhos realizados, em sua maioria, visando a detecção da ocorrência de determinado agente de controle biológico numa população de pragas, bem como a verificação da patogenicidade ou eficiência de algum agente de controle em potencial.

Sendo assim, a utilização de predadores, parasitóides ou agentes de controle microbiano (fungos, bactérias, vírus, protozoários) continua ainda a ser um campo aberto dentro da pesquisa com pragas de grãos armazenados. Constitui numa alternativa viável e segura, desde que acompanhada de estudos básicos e técnicas que

permitam sua utilização de maneira eficiente.

2.2.4.1 - Predadores e parasitóides

De acordo com WAIB (1992), a utilização de predadores e parasitóides não seria capaz de eliminar uma população de pragas de grãos armazenados, e isso também não seria desejável, pois a relação inimigo natural-praga é dependente da densidade populacional, e a completa eliminação de uma população do hospedeiro ou presa eliminaria também o inimigo natural. Além disso, pode-se considerar que o uso de parasitóides e predadores pode representar uma maior quantidade de resíduos no produto a ser consumido.

Numa abordagem mais restrita, pode-se dizer que, no caso de pragas de grãos armazenados, é necessário que se tenha a idéia de que a simples presença da praga já constitui dano econômico, e que o conceito de manejo deve ser um pouco diferenciado, não existindo um nível de dano pré-estabelecido.

HAINES (1984) cita como exemplos de predadores que atacam pragas de grãos armazenados o ácaro *Cheyletus eruditus* (Schränk)(Acarina, Cheyletidae), atacando larvas jovens de coleópteros e *Blattisocius tarsalis* (Berlese)(Acarina, Ascidae), predador de ovos de

Ephestia cautella (Hübner)(Lepidoptera, Pyralidae), bem como ovos de *T. castaneum*. ZDÁRKOVÁ & HORÁK (1990) relatam que o predador *Cheyletus eruditus* ataca os ácaros pragas de grãos armazenados, sendo eficiente para a desinfestação de depósitos numa relação de 2000 a 3000 predadores por 100 m².

Xylocoris flavipes (Reuter)(Hemiptera, Anthocoridae) é citado como predador de *T. castaneum* e *Oryzaephilus surinamensis* (L.)(Col.: Silvanidae) (ARBOGAST, 1976; PRESS et al., 1975).

REES (1991) testou a eficiência de *Teretriusoma nigrescens* (Lewis)(Col.: Histeridae) sobre *Prostephanus truncatus* (Horn), *Dinoderus minutus* (Fab.) e *R. dominica*, obtendo 83, 91 e 36% de redução nas populações destes insetos, respectivamente.

Com relação a parasitóides, é citada a espécie *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hym.:Pteromalidae), atacando estágios imaturos de *S. oryzae* (CLINE et al., 1985) e larvas de *Lasioderma serricorne* (Fab.) (Col.: Anobiidae) (BARE, 1942). ARBOGAST & MULLEN (1990), estudando as interações entre *S. zeamais* e *A. calandrae* concluíram que o parasitóide pode ser um agente de controle efetivo se for introduzido em número suficiente e no início do período de armazenamento, para suprimir o crescimento inicial das populações do gorgulho.

Também são relatados casos de parasitismo por *Choetospila elegans* Westwood (Hym.: Pteromalidae) e *Heterospilus prosopidis* Viereck (Hym.: Braconidae) sobre *Sitophilus* spp. (WILLIAMS & FLOYD, 1971; ALMEIDA & MATIOLI, 1984), e sobre os bruquídeos *Callosobruchus chinensis* (L.) e *Z. subfasciatus* (HASSEL et al., 1985; KISTLER, 1985).

2.2.4.2 - Protozoários, vírus e bactérias

Segundo GEORGE (1972), o protozoário *Nosema whitei* Weiser ataca larvas de *T. castaneum*, sendo que, durante os primeiros 15 dias de infecção, o microrganismo consome grandes quantidades dos corpos gordurosos do hospedeiro, causando um déficit na reserva de nutrientes, prejudicando a passagem das larvas para o estágio pupal.

KELLEN & LINDEGREN (1971) relatam que *Nosema* pode ser transmitido oralmente, por via transovariana e sexualmente. Em *P. interpunctella* foi observada a infecção nos órgãos reprodutivos de ambos os sexos, reduzindo a fecundidade dos adultos.

KHAN & SELMAN (1988) trataram larvas recém-eclodidas de *T. castaneum* com *N. whitei* e com uma mistura do protozoário e do inseticida pirimifós-metil, encontrando maior eficiência da mistura que do protozoário ou do inseticida isoladamente. Também KHAN & SELMAN (1989)

avaliaram aspectos biológicos importantes de algumas espécies de *Nosema*, avaliando seu potencial como agentes de controle de coleópteros pragas de grãos armazenados.

GHOSH & SAHA (1992) ofereceram várias doses de *Nosema* sp. a larvas de 3º e 4º instares de *L. serricorne*. Uma dose de 3×10^3 esporos por indivíduo resultou em 39% de mortalidade, redução do peso larval e de adultos, e produção de $1.28 \pm 0.2 \times 10^2$ esporos por larva e $1.1 \pm 0.2 \times 10^2$ esporos por adulto infectado. Com 3×10^5 esporos por indivíduo, 88% das larvas e 73% dos adultos morreram, produzindo $3.91 \pm 0.2 \times 10^2$ esporos por larva e $2.89 \pm 0.2 \times 10^2$ esporos por adulto infectado. A mortalidade foi causada por sérios danos no epitélio do mesêntero e corpos gordurosos dos insetos.

LEVIVELDT **et al.** (1988) estudaram a distribuição e taxa de infecção de *P. truncatus*, importante praga do milho armazenado na África, por *Mattesia* sp., que foi encontrado em 30% dos locais avaliados, com taxa de infecção variando entre 1 e 6%. Também com relação a esta praga, PURRINI & KEIL (1989) encontraram o protozoário *Ascogregarina bostrichidorum* n.sp., atacando uma população natural do inseto.

RABINDRA **et al.** (1988) concluíram que larvas de *T. castaneum* infectadas com *Farinocystis tribolii* ficaram mais suscetíveis ao malatíon, clorpirifós,

fenvalerato e cipermetrina, podendo ser este fato devido à redução no consumo de alimento e conseqüente diminuição do vigor nutricional da praga.

RUHNKE & JANOVY JR. (1989) determinaram que *Gregarina cuneata* se localiza na região mais anterior do intestino das larvas de *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae), enquanto que *G. steini* se restringe à porção posterior do mesêntero, sendo que essas relações interespecíficas não parecem ser responsáveis pelas diferenças entre as duas espécies de protozoários.

A utilização de vírus entomopatogênicos se refere mais precisamente a tentativas de controle de lepidópteros pragas de grãos armazenados. HUNTER et al. (1979) expuseram lagartas recém-eclodidas de *P. interpunctella* a 5 concentrações do vírus da granulose (GV). A concentração letal mediana (CL₅₀) estimada esteve entre 1×10^3 a 1×10^4 cápsulas/ml de suspensão. Os grãos tratados com 1×10^3 cápsulas/ml foram protegidos do ataque da praga por até 4 meses, sendo as mortalidades obtidas de 95,2 e 96,9% após 14 e 9 semanas da aplicação, respectivamente.

VAIL et al. (1991), também trabalhando com *P. interpunctella*, conduziram testes com vírus da granulose, testando 2 concentrações da formulação a temperaturas de 27, 32 e 38°C por 0, 1, 2, 6 e 12 meses.

Também foi determinada a eficiência da formulação sobre amostras já infestadas, à temperatura de 27°C. Nas temperaturas maiores, ou seja, 32 e 38°C, o efeito do produto diminuiu após 3 meses da aplicação. Também VAIL *et al.* (1993) estudaram a disseminação do vírus da granulose, inoculando adultos machos sadios de *P. interpunctella* com uma formulação pó seco do vírus. Durante a cópula, os machos contaminaram as fêmeas, e as larvas descendentes foram infectadas com o vírus, resultando em mortalidades de 60 e 50% nas gerações F₁ e F₂, respectivamente.

A utilização de bactérias entomopatogênicas também se refere mais a lepidópteros pragas de grãos armazenados. Sabe-se que o principal patógeno desta categoria, *Bacillus thuringiensis* Berliner, já é comercializado mundialmente, sendo recomendado para o uso sobre as formas larvais de lepidópteros em diversas culturas. Mais recentemente, uma nova variedade dessa bactéria, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* vem sendo testada sobre coleópteros pragas de grãos, sendo seu uso comercial ainda incipiente.

MARDAN & HAREIN (1984), buscando alternativas para contornar o problema da resistência de *P. interpunctella* a inseticidas, conduziram testes com *B. thuringiensis* sobre uma raça desta praga resistente ao malathion. Cinco instares do inseto foram expostos a 6

concentrações dos produtos Dipel e Thuricide misturados em dieta artificial. Os primeiros instares larvais foram mais suscetíveis ao patógeno, sendo a formulação Dipel mais eficiente que Thuricide.

KRAMER et al. (1985) compararam os tratamentos de trigo armazenado com fenoxicarb, malation e *B. thuringiensis*, para o controle de diversas pragas. O fenoxicarb foi mais eficiente para o controle de *S. oryzae*, *T. confusum*, *P. interpunctella* e *R. dominica*, sendo o malation na mesma dosagem (10 ppm) e o *B. thuringiensis* (125 ppm/10 cm superfície) considerados inadequados para o controle dessas pragas.

SALAMA et al. (1991) realizaram um "screening" com 23 culturas de *B. thuringiensis* com respeito à sua eficiência para o controle de *P. interpunctella* e *S. cerealella*. A variedade mais eficiente para o controle de *P. interpunctella* foi *B. thuringiensis* var. *dendrolinus* (HD-34), sendo que as lagartas de *S. cerealella* foram mais suscetíveis às variedades *kurstaki*, *tolworthi*, *galleriae*, *entomocidus* e *aizawai*.

SALAMA & ABDEL-RAZEK (1992) avaliaram o efeito do tipo de alimento fornecido a *P. interpunctella* e *S. cerealella* sobre sua suscetibilidade a *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Foram fornecidos como alimento uma dieta semi-artificial, grãos de milho inteiros e quebrados, sendo

verificada grande variação na suscetibilidade dos insetos ao patógeno, decorrendo em menor emergência de adultos e maior ocorrência de deformações. Esse efeito se deve à maior taxa de consumo alimentar na dieta semi-artificial, que foi o alimento que resultou na maior eficiência do patógeno.

Com relação a um possível desenvolvimento de resistência de pragas ao *B. thuringiensis*, McGAUGHEY (1985) relata que *P. interpunctella* desenvolve resistência ao patógeno em poucas gerações. Os níveis de resistência cresceram 30 vezes em uma população criada em dieta com *B. thuringiensis* e depois de 15 gerações atingiu 100 vezes mais que o controle. A resistência desenvolvida mostrou-se estável, mesmo quando cessado o processo de seleção, e pareceu ser devida a um conjunto gênico recessivo. Mais tarde, McGAUGHEY & BEEMAN (1988) citaram que populações dos piralídeos *P. interpunctella* e *Cadra cautella* (Walker) criadas em dietas com *B. thuringiensis* tornaram-se resistentes, mas a resistência não se desenvolveu da mesma forma em todas as populações estudadas. Em *Plodia*, os níveis de resistência cresceram de 2 para 29 vezes após 3 gerações, e de 15 para 100 vezes após 40 gerações. Já em uma população de *Cadra*, só houve crescimento de 7 vezes em 21 gerações. Os níveis de estabilidade da resistência desenvolvida decresceram quando a seleção foi interrompida

antes de atingir um certo nível limite. Isso indica que, ao contrário do que foi dito anteriormente (McGAUGHEY, 1985), a resistência é parcialmente recessiva e independente dos marcadores genéticos recessivos.

No Brasil, AMARAL FILHO (1986) desenvolveu estudos biológicos e patológicos com os piralídeos *A. kuehniella* e *P. interpunctella*, realizando experimentos com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em três formulações comerciais: Dipel, Bactospeine e Thuricide, e mais um isolado não comercial, Zoocamp-78. O autor descreveu o quadro sintomatológico da doença constituído de regurgitação, diarreia, flacidez, parada alimentar, escurecimento do tegumento e morte das formas larvais. Houve suscetibilidade das duas pragas ao patógeno estudado, com diferenças quanto ao preparado mais eficiente, de acordo com a idade das larvas.

Já WAIB (1992) avaliou a patogenicidade de dois preparados experimentais à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* sobre coleópteros pragas de grãos e subprodutos armazenados, avaliando o estágio de desenvolvimento mais suscetível para cada espécie, bem como observações de sintomatologia externa e dinâmica de germinação dos esporos em meio artificial. Foram estudadas as espécies *S. zeamais*, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Col.: Laemophloeidae), *L. serricorne*, *T. molitor*,

Tribolium sp. e *Carpophilus* sp. Houve diferenças entre a suscetibilidade de larvas e adultos das espécies estudadas aos dois preparados avaliados, e também com relação à esporulação dos produtos em meio de cultura, o que pode explicar a maior ou menor eficiência de um ou outro preparado sobre as diferentes pragas.

2.2.4.3 - Fungos entomopatogênicos

As relações existentes entre os fungos e as diversas espécies de insetos pragas de grãos armazenados podem ser notadas com relação aos fungos que são comumente encontrados no ambiente de armazenamento, como aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que causam danos aos produtos armazenados. Os insetos podem ter seu desenvolvimento normal alterado quando em presença destes microrganismos, ou mesmo, em alguns casos, utilizá-los como alimento (DUNKEL, 1988).

SRINATH et al. (1973) estudaram o papel de algumas espécies de *Aspergillus* no desenvolvimento de *S. oryzae*, indicando que pode ocorrer incremento ou inibição do crescimento populacional do inseto quando em presença deste fungo. Também SINHA & SINHA (1991) verificaram que quando ocorre a infestação de grãos de trigo com *S. oryzae*, a infecção dos grãos por *Aspergillus flavus* Link é bem

maior, com o aumento que ocorre na umidade dos grãos.

WYROSTKIEWICZ & BLAZEJEWSKA (1978) verificaram um decréscimo no número de indivíduos de *Sitophilus granarius* (L.) (Col.: Curculionidae) quando *Aspergillus fumigatus* Frenesius estava presente no alimento do inseto. Também houve alongamento do período de desenvolvimento do inseto nas parcelas tratadas com o fungo. Com relação a *S. zeamais*, a exposição do inseto a *Aspergillus parasiticus* Speare e *A. flavus* resultou na mortalidade dos mesmos, correlacionada com os níveis de contaminação dos insetos pela aflatoxina produzida pelos fungos (McMILLIAN et al., 1981).

DUNKEL (1988) defende a hipótese de que o conhecimento das relações biológicas básicas entre insetos e fungos no ecossistema de armazenamento pode abrir novos caminhos para o manejo do sistema. O que ocorre é que alguns fungos são fonte de atração para insetos e promovem seu crescimento populacional, e outros os repelem e secretam toxinas maléficas para os mesmos. Por outro lado, alguns insetos são disseminadores de fungos, e outros desfavorecem o desenvolvimento desses microrganismos. Dessa forma, conhecendo-se e aproveitando-se essas características, e juntando-se a isso o fato de que existem certas semelhanças morfofisiológicas e bioquímicas entre fungos e estágios iniciais de desenvolvimento de insetos,

sugere-se que um novo grupo de defensivos, os chamados fungicidas-inseticidas, possa ser utilizado, encaixando-se nesse grupo substâncias como o ácido sórbico.

Com relação à ocorrência de fungos entomopatogênicos e sua possível utilização no controle de pragas de grãos armazenados, objeto direto do presente estudo, poucos são os trabalhos que se referem a este assunto, sendo, na sua maioria, trabalhos para verificação da patogenicidade do fungo a determinada praga, ou estudos básicos de condições ambientais necessárias ao desenvolvimento do processo de doença.

Num dos primeiros estudos a esse nível, STEINHAUS & BELL (1953) procuraram avaliar o efeito de diversos microrganismos e substâncias antibióticas que pudessem ser utilizadas para o controle de *S. granarius*, *S. oryzae*, *R. dominica* e *T. confusum*. Os autores consideraram que certos fatores como a baixa suscetibilidade dos adultos dessas pragas à infecção microbiana, e o difícil acesso às larvas de algumas espécies que se localizam no interior dos grãos dão margem a uma perspectiva pessimista sobre a utilização de microrganismos para o controle dessas pragas. O fato de que várias espécies diferentes ocorrem ao mesmo tempo num determinado local também complicaria este quadro. Os resultados obtidos mostraram que apenas *B. thuringiensis* exibiu a consistência e vigor de infecção indicativos de um

verdadeiro patógeno. O fato de que o fungo *B. bassiana* causou 20 a 30 % de infecção em 3 dos insetos testados chamou a atenção dos autores com relação às condições adversas de umidade encontradas pelos microrganismos, pois os testes foram conduzidos em condições de aproximadamente 70 % de umidade relativa. Os autores sugeriram que pode ter ocorrido uma mudança na via de infecção, com a ingestão de conídios do fungo, que penetraram diretamente pelo canal alimentar dos insetos, favorecendo a infecção. Porém, os níveis de infecção alcançados não foram considerados significativos para sugerir o uso de fungos entomopatogênicos para o controle desses insetos.

SEARLE & DOBERSKI (1984) estudaram o efeito do fungo *B. bassiana* sobre *O. surinamensis*. Alguns experimentos com diferentes temperaturas mostraram que a infecção pode ocorrer até abaixo de 7°C. Houve pouca diferença na mortalidade obtida quando os insetos foram expostos às concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml de suspensão. Por outro lado, esses autores consideraram a umidade como o fator mais crítico, afirmando não ocorrer infecção com valores abaixo de 90 % de umidade relativa. Quando os conídios foram misturados a grãos de trigo infestados posteriormente com *O. surinamensis*, não se verificou efeito na mortalidade dos adultos; porém, houve um decréscimo no número de larvas e pupas resultantes

desses tratamentos.

FERRON & ROBERTS (1975) realizaram testes com o caruncho-do-feijão *A. obtectus*, nos quais os insetos foram expostos a várias concentrações de conídios de *B. bassiana*, *Beauveria tenella*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces fumoso-roseus*. As suspensões de conídios foram aspergidas em placas de Petri, onde os insetos adultos de idade conhecida foram colocados, permanecendo em contato com o inóculo por um período de 24 horas, sendo depois removidos e mantidos à temperatura de 20°C. Decorridos 20 dias, determinou-se a mortalidade dos insetos, verificando-se a ocorrência de infecção nas concentrações de 5×10^6 a 1×10^9 conídios/ml dos 4 patógenos.

FERRON (1977), trabalhando com a influência da umidade relativa no desenvolvimento de *B. bassiana* em adultos de *A. obtectus*, e baseando-se nos resultados anteriores (FERRON & ROBERTS, 1975), formulou a hipótese de que a infecção fúngica se processa segundo 3 fases: 1) a primeira fase é menos dependente das condições de umidade relativa do que se podia prever, devido, possivelmente, a uma camada de ar úmido que envolve o tegumento do inseto em situação análoga ao que ocorre com as plantas; 2) a fase de incubação, caracterizada pelo desenvolvimento do micélio e produção de toxinas na hemolinfa do inseto, ocorre em condições relativamente independentes da umidade relativa

do ambiente: 3) a fase saprofítica e reprodutiva do fungo, caracterizada pela invasão de todos os tecidos pelo micélio, gerando um cadáver mumificado e o desenvolvimento dos conidióforos na superfície do corpo do inseto, é associada com altos níveis de umidade, próximos do nível de saturação.

Assim, nota-se que é perfeitamente possível que o fungo penetre no inseto, colonize seus tecidos, levando-o à morte, e não complete o ciclo da doença, em condições de baixa umidade, como é o caso do ambiente de armazenamento, onde é até desejável a não esporulação do fungo, acarretando em menor volume de resíduos biológicos nos grãos.

HLUCHY & SAMSINAKOVA (1989) estudaram a suscetibilidade de larvas do 3º instar de *Galleria mellonella* (L.) (Lep.: Pyralidae) e adultos de *S. granarius* ao fungo *B. bassiana*. Esse trabalho testou o efeito da formulação comercial "Boverosil", registrada na Tchecoslováquia para o controle de infestações residuais de pragas de grãos armazenados. Foi obtida uma CL₅₀ de $1,14 \times 10^8$ conídios/ml de suspensão para *G. mellonella* e entre 2×10^8 e 5×10^8 conídios/ml de suspensão para *S. granarius*. Também FRYDOVA et al. (1989) testaram duas formulações "Boverosil" e "Boverol", sobre *S. granarius*, *O. surinamensis* e *T. castaneum* em condições de laboratório. As

duas primeiras espécies foram mais suscetíveis às preparações que *T. castaneum*, sendo que o produto "Boverosil" foi o mais eficiente.

JASSIM et al. (1988) testaram o fungo *B. bassiana* nas dosagens de 1.5×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 e 4×10^5 conídios/cm³ para o controle de lagartas do piralídeo *Cadra cautella* em tâmaras armazenadas em depósitos no Iraque. As dosagens de 3×10^5 e 4×10^5 conídios/cm³ foram as mais eficientes, resultando em 96,6 e 98,6% de mortalidade, respectivamente.

THRONE (1989) descreveu uma espécie de *Dimeromyces* (Ascomycetes, Laboulbeniales) ocorrendo em *C. ferrugineus* associado com grãos armazenados na Carolina do Sul (EUA). O fungo foi observado ocorrendo no último segmento abdominal visível dos besouros adultos, e ainda não haviam sido feitos testes de patogenicidade e eficiência de controle envolvendo este novo patógeno.

No Brasil poucos trabalhos foram realizados avaliando o efeito de fungos entomopatogênicos sobre pragas de grãos armazenados. FERNANDES et al. (1983) relataram, em comunicação científica, o início de pesquisas para avaliar as possibilidades de controle do caruncho-do-caupi *C. maculatus* por meio do fungo *M. anisopliae*. Num primeiro ensaio, foi aplicada uma suspensão de $3,26 \times 10^8$ conídios/ml, resultando em 100% de mortalidade contra 33% na testemunha.

Mais adiante, sementes pré-emergidas de caupi foram imersas na suspensão fúngica e oferecidas aos insetos, causando 95% de mortalidade, contra 26% na testemunha.

RODRIGUES & PRATISSOLI (1990) conduziram testes de laboratório para avaliar a eficiência dos fungos *Beauveria bronginiarti* e *M. anisopliae* sobre *S. zeamais* e *A. obtectus*. Os autores constataram que os fungos foram patogênicos às pragas estudadas, além de concluir sobre sua eficiência na proteção dos grãos de milho e feijão armazenados por um período de 6 meses.

LOURENÇÃO et al. (1993) avaliaram a eficiência de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e pirimifós-metil, em condições de laboratório, quando adicionados a grãos de milho, para o controle de *S. zeamais*. Os fungos foram estudados em duas dosagens: 2,5 g de arroz+fungo e 1,25 g de arroz+fungo, e o inseticida aplicado em 4 a 6 mg/Kg de grãos. Os resultados indicaram que o inseticida promoveu 100% de controle na primeira semana. *B. bassiana* causou mortalidades de 100 e 98,4 % nas dosagens de 2,5 e 1,25 g de arroz+fungo, respectivamente, sendo que *M. anisopliae* só atingiu 86,5% de mortalidade com a maior dosagem após 4 semanas.

Quando se trabalha com material que possa vir a ser consumido (grãos) ou seja utilizado como matéria-prima para alimentos manufaturados (farinhas, farelos,

rações), deve-se ter em mente possíveis problemas relacionados com segurança, principalmente com relação ao homem e animais de sangue quente.

SEARLE & DOBERSKI (1984), citando Burgues (1981)¹, relataram que há algumas dúvidas sobre a ocorrência de alergias dermais e respiratórias quando se manipula grande quantidade de conídios, como no caso de *B. bassiana*.

IGNOFFO (1973) reportou que fungos do gênero *Beauveria* não são capazes de se desenvolver à temperatura do corpo dos mamíferos, a cerca de 37°C.

Segundo SAIK et al. (1990), citando Ishibashi et al. (1987)², vários testes foram realizados avaliando os efeitos de *B. bassiana* sobre a membrana da córnea, passível de infecção por este fungo, revelando fraca patogenicidade do fungo, sem invasão da câmara ocular anterior.

SIEGEL & SHADDUCK (1990) relatam que *M. anisopliae* não é tóxico a animais de laboratório e não foi ainda reportado infectando seres humanos.

¹BURGES, H.D. Safety testing and quality control of microbial pesticides. In: BURGES, H.D. **Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980**. New York, Academic Press, 1981. p. 737-767.

²ISHIBASHI, Y.; KAUFAM, H.E.; ICHINOE, M.; KAGAWA, S. The pathogenicity of *Beauveria bassiana* in the rabbit cornea. **Mycosen**, 30 115, 1987.

Sendô assim, é necessário ressaltar que a possibilidade do uso de fungos entomopatogênicos em grãos armazenados prevê a realização de testes de toxicidade, ainda não bem definidos por legislação pertinente, bem como o manuseio correto, com equipamento seguro, a despeito de ser um produto biológico. Pode-se salientar também, que a viabilidade do patógeno decresce após determinado tempo em condições insatisfatórias (ALVES, 1986a), o que contribui para que não haja resíduos que permitam o seu desenvolvimento, além da sua inviabilização quando submetido a altas temperaturas, que ocorrem no preparo dos subprodutos dos grãos (farinhas, farelos, etc.).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 - Criação e manutenção dos insetos

Os ensaios foram conduzidos utilizando-se três espécies de insetos pragas de grãos armazenados: *Sitophilus oryzae* (L., 1763), *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 e *Rhyzopertha dominica* (Fabr., 1792), oriundos de criação própria do referido laboratório.

A criação foi iniciada a partir de amostras das três espécies, fornecidas pela Seção de Entomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Os insetos foram criados em recipientes de vidro com capacidade aproximada de 0,9 l, cobertos com tampa telada de tecido fino do tipo "voil". Como alimento utilizaram-se inicialmente grãos de arroz beneficiado, perfazendo 2/3 do volume dos recipientes. No decorrer do trabalho procedeu-se

à substituição do arroz beneficiado por uma mistura de grãos de milho e trigo integros e moidos, permitindo melhor desenvolvimento dos insetos e resultando em maior número de indivíduos para a realização dos testes. A criação foi mantida em sala fechada, com temperatura de aproximadamente 26°C, sendo o alimento renovado a cada dois meses, ocasião em que era realizada a revisão da criação.

3.2 - Obtenção dos isolados dos fungos

Foram utilizados para os ensaios de patogenicidade e demais testes, isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, de diversos hospedeiros e localidades, provenientes do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP (Tabela 1).

Os isolados foram mantidos à temperatura de 4±2°C, em tubos de vidro com sílica-gel mais leite desnatado a 10%, ou em recipientes de vidro contendo porções de colônias suspensas em água destilada estéril. Por ocasião dos testes, os isolados foram repicados e multiplicados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) ou MC (meio específico para produção de conídios de *B. bassiana*), autoclavados a 120°C por 20 minutos. As placas de Petri e demais vidrarias foram esterilizadas por calor

seco em estufas a 180°C por um período de 2 horas.

Os meios de cultura utilizados têm a seguinte composição:

a) BDA (batata-dextrose-ágar):

Ágar	20,00 g
Batata sem casca	200,00 g
Dextrose	15,00 g
Estreptomicina	0,50 g
Água destilada	1000,00 ml

b) Meio para produção de conídios de *B.bassiana* (MC):

KH ₂ PO ₄	0,36 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,60 g
KCl	1,00 g
Glucose	10,00 g
NaNO ₃	1,58 g
Extrato de levedura	5,00 g
Ágar	20,00 g
Água destilada	1000,00 ml

Tabela 1. Procedência e hospedeiros dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizados nos testes com *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica*.

Isolado (nº)	Procedência	Hospedeiro
E-9 *	Boca da Mata-AL	<i>Mahanarva posticata</i>
PL-10 *	Indaiatuba-SP	<i>Zulia entreriana</i>
PL-42 *	Campos-RJ	<i>Mahanarva posticata</i>
PL-43 *	Flexeiras-AL	<i>Mahanarva posticata</i>
61	Espírito Santo	<i>Cosmopolites sordidus</i>
104 *	Maceió-AL	<i>Cosmopolites sordidus</i>
196	Ipojuca-PE	<i>Diatraea saccharalis</i>
197	Araras-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
255 *	Piracicaba-SP	<i>Anthonomus grandis</i>
256	ENGOPA-GO	<i>Decis flavopicta</i>
268	Carpina-PE	<i>Diatraea saccharalis</i>
292	Piracicaba-SP	<i>Anthonomus grandis</i>
319 *	Goiânia-PE	Cercopidae
341	Iracemópolis-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
353	Piracicaba-SP	Pentatomidae
428	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
447	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
457	ENGOPA-GO	<i>Euschistus heros</i>
458	ENGOPA-GO	<i>Piezodorus</i> sp.
476	Piracicaba-SP	<i>Cosmopolites sordidus</i>
484	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
499	Argentina	<i>Diabrotica speciosa</i>
500	Argentina	<i>Nezara viridula</i>
501	Argentina	<i>Maecolaspis monrosi</i>
524	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
529	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
532	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
534	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
536	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
538	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
542	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
543	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
544	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
548	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
549	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
550	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
554	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
558	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
562	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
569	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
571	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.

Isolado (nº)	Procedência	Hospedeiro
572	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
573	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
579	Piracicaba-SP	<i>Canton</i> sp.
589	Piracicaba-SP	<i>Nezara viridula</i>
600	Cuiabá-MT	amostra de solo
601	Cuiabá-MT	amostra de solo
602	Cuiabá-MT	amostra de solo
604	Cuiabá-MT	amostra de solo
606	Cuiabá-MT	amostra de solo
607	Cuiabá-MT	amostra de solo
617	CNPAF-GO	Pentatomidae
618	CNPAF-GO	<i>Tibraca limbativentris</i>
619	CNPAF-GO	Pentatomidae
620	CNPAF-GO	<i>Nezara viridula</i>
641	Anhembi-SP	<i>Scapteriscus</i> sp.
643	Lavras-MG	amostra de solo
674	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
695	Londrina-PR	<i>Metamasius hemipterus</i>
791	Londrina-PR	<i>Solenopsis</i> sp.
798 *	Londrina-PR	<i>Solenopsis invicta</i>
860 *	Piracicaba-SP	<i>Macrospis zincta</i>
865 *	Piracicaba-SP	Homoptera
866 *	Piracicaba-SP	<i>Atta</i> sp.
940	Sto. A. de Posse-SP	<i>Diabrotica speciosa</i>
943	Marilândia-ES	<i>Hypothenemus hampei</i>
969	Piracicaba-SP	<i>Blatella germanica</i>
986	Piracicaba-SP	<i>Boophilus microplus</i>
987	Rio das Pedras-SP	<i>Heterotermes</i> sp.
988	Piracicaba-SP	<i>Cryptotermes</i> sp.
1003	Piracicaba-SP	Chrysomelidae
1010	Irlanduba-AM	<i>Diabrotica aglobini</i>

* = isolados de *M. anisopliae*

3.3 - Seleção dos isolados mais virulentos

Visando selecionar os isolados mais eficientes para o controle das pragas *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica*, foram conduzidos testes com 72 isolados dos

fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, caracterizando um "screening" dos mesmos.

Os isolados foram repicados e multiplicados tomando-se algumas pedras de sílica-gel ou porções de colônias, de acordo com a forma em que se encontravam armazenados os microrganismos, e colocando o inóculo sobre placas de Petri com meio de cultura BDA. As placas foram acondicionadas em câmaras para BOD a $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, com fotofase de 12 horas. Após 7 dias, os fungos em crescimento foram repicados para outras placas com meio de cultura (BDA ou MC), e com o auxílio de alça de Drugalsky, foram espalhados por toda a extensão das placas. Após 10 dias, nas mesmas condições anteriores, foram obtidas placas cheias com conídios dos isolados multiplicados.

Os isolados das duas espécies de fungos foram inoculados em 30 insetos adultos de cada espécie de praga. Os insetos foram colocados diretamente em contato com os conídios do fungo nas placas de Petri por 1 minuto, visando oferecer um alto potencial de inóculo, garantindo o contato do patógeno com toda a superfície do corpo dos insetos (Figura 1). Em seguida, os mesmos foram transferidos para recipientes plásticos de 4,5 cm de diâmetro por 6,5 cm de altura com tampa plástica perfurada, contendo arroz beneficiado como alimento.

Figura 1. Inoculação dos insetos nas placas de Petri visando oferecer um alto potencial de inóculo (primeira fase de seleção).

Cada tratamento constou de três recipientes, com 10 insetos (3 repetições). Os recipientes foram acondicionados em câmaras para BOD nas mesmas condições citadas anteriormente.

Foram feitas avaliações durante 10 dias, coletando-se os insetos mortos, e procedendo-se a lavagem dos cadáveres em álcool puro e água destilada, com o objetivo de eliminar contaminações superficiais. Em seguida, os cadáveres foram colocados em placas de poliestireno, com orifícios para a individualização dos mesmos (Figura 2). Estas placas foram acondicionadas em recipiente plástico hermético, do tipo "Tupperware", com fundo de espuma plástica, formando uma câmara úmida (Figura 3). Decorridos 2 a 3 dias, todo material era examinado sob microscópio estereoscópico verificando-se a conidiogênese dos fungos nos cadáveres, e confirmando-se a mortalidade pelos patógenos.

Foram calculadas as mortalidades totais confirmadas para cada isolado, após 10 dias de avaliação, corrigindo-se a mortalidade na testemunha pela fórmula de Abbott (ALVES, 1986b).

Figura 2. Placa plástica com orifícios para individualização dos insetos utilizada para a confirmação da mortalidade causada pelos patógenos.

Figura 3. Câmara úmida composta de recipiente plástico hermético e espuma umedecida utilizada para a confirmação da mortalidade causada pelos patógenos.

3.4 - Avaliação da eficiência dos isolados selecionados no "screening"

Foram realizados bioensaios com o material selecionado na fase de "screening", seguindo-se praticamente a mesma metodologia utilizada anteriormente, sendo desta vez o inóculo quantificado, permitindo uma melhor comparação entre a eficiência dos isolados testados.

3.4.1 - Estabelecimento da dosagem padrão

Foram conduzidos testes prévios com *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica*, sendo os insetos submetidos aos isolados mais eficientes (100 % de mortalidade) para as respectivas pragas, na fase anterior de seleção.

Estes testes tiveram por objetivo a determinação de uma dosagem padrão que permitisse a execução de bioensaios com os isolados selecionados, avaliando-se, então, a eficiência dos mesmos, por meio de comparação dos valores de TL₅₀ (tempo letal médio) na dosagem determinada.

Assim, testou-se, numa primeira ocasião, uma modificação na metodologia, utilizando-se a via de inoculação líquida, aspergindo-se suspensões de 10^5 a 10^9

conídios/ml sobre 50 insetos, sendo os resultados insatisfatórios, não permitindo a determinação de uma dosagem padrão. Optou-se, então, por seguir a mesma metodologia da fase de "screening", colocando-se os insetos em contato direto com uma quantidade conhecida de inóculo.

Foram utilizados 50 insetos para cada tratamento, colocando-os em contato com as dosagens de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1 g de conídios dos isolados testados, em tubos de vidro de 8,5 cm de altura por 2,0 cm de diâmetro, cobertos com uma película de parafilme, com agitação manual por 30 segundos. Em seguida, os insetos foram transferidos para os recipientes plásticos contendo arroz beneficiado como alimento, em número de 10 insetos por recipiente (5 repetições), sendo acondicionados em câmaras para BOD a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Avaliou-se a mortalidade diária, com posterior confirmação da mortalidade pelo patógeno em câmara úmida, possibilitando efetuar a análise de Probit, para a determinação da dosagem que mais se aproximou da mortalidade de 100%, após 10 dias de avaliação.

3.4.2 - Bioensaios com os isolados selecionados

Após o estabelecimento da dosagem padrão,

procedeu-se à realização de bioensaios com os isolados selecionados anteriormente, visando comparar os valores de TL₅₀ obtidos, permitindo, desta forma, uma melhor visualização da eficiência destes isolados. Foi utilizada a mesma metodologia dos testes para estabelecimento da dosagem padrão, ou seja, colocando-se os insetos em contato direto com os conídios, quantificados previamente, na dosagem estabelecida. Foi avaliada, da mesma forma, a mortalidade diária dos insetos, confirmando-se os resultados obtidos, em câmara úmida e procedendo-se a análise de Probit, para determinação dos valores de TL₅₀ e teste de Tukey para comparação entre as médias de mortalidade total confirmada.

3.5 - Estudos de dosagens a serem aplicadas sobre os grãos

Foram realizados bioensaios com os isolados selecionados na etapa anterior, com a finalidade de determinar as quantidades de conídios adequadas para a aplicação do patógeno diretamente nos grãos.

De forma análoga ao que já foi feito na etapa anterior, os isolados foram multiplicados em meio específico para produção de conídios de *B. bassiana* (MC) sendo, em seguida, as placas de Petri transferidas para

câmaras para BOD a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas, por um período de 10 dias.

Atendendo à necessidade de um maior volume de inóculo dos isolados para a realização dos bioensaios, durante esta etapa, o material, após o período de incubação, foi inoculado em meio de arroz pré-cozido, segundo o processo "Biomax", descrito por ALVES (1986c). Dessa forma, sacos de polipropileno contendo arroz pré-cozido e autoclavado foram inoculados com suspensões dos isolados selecionados, obtidas do material multiplicado em meio de cultura, sendo posteriormente acondicionados em câmaras para BOD a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas, por cerca de 3 dias. Em seguida, o material, já com o desenvolvimento micelial do fungo, foi retirado dos sacos e transferido para bandejas plásticas onde permaneceu por cerca de 10 dias, até a conidiogênese e secagem do produto. Finalmente, procedeu-se à separação dos conídios, por meio de peneiramento, sendo o material obtido armazenado em "freezer", sob temperatura de aproximadamente -10°C .

Devido aos bons resultados obtidos nos bioensaios anteriores, com o objetivo de se determinar a dosagem padrão para comparação dos isolados selecionados no "screening" inicial, utilizou-se metodologia semelhante durante esta etapa, para o estabelecimento da dosagem a ser aplicada nos grãos.

Foram utilizados inicialmente 50 insetos para cada tratamento, com as dosagens de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1 g de conídios peneirados contendo aproximadamente $1,2 \times 10^{11}$ conídios/g dos isolados selecionados adicionadas a 100 g de arroz beneficiado, sendo o material misturado por meio de agitação vigorosa, em sacos plásticos de 0,5 l de volume. Em seguida, o material (arroz + fungo) foi dividido em 5 recipientes plásticos, já utilizados na etapa anterior, onde foram colocados 10 insetos, totalizando 5 repetições por tratamento. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados em estufas para BOD sob a temperatura de $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas, sendo a mortalidade avaliada diariamente. Observou-se, porém, que os resultados não condiziam com o que havia sido obtido nas etapas anteriores de seleção dos isolados, pois as maiores mortalidades obtidas não ultrapassaram 50 %, após 10 dias, nas maiores dosagens (0,05 e 0,1 g/100 g de grãos), além de não ocorrer uma discriminação significativa entre as dosagens.

Procedeu-se, então, à repetição dos bioensaios, utilizando-se a mesma metodologia, tomando-se especial cuidado com a viabilidade dos isolados, verificada por meio de plaqueamento em meio BDA. Observou-se viabilidade de 100 % após 20 horas do plaqueamento, o que

descartou a possibilidade de algum problema com o inóculo. Todavia, mais uma vez, não se repetiram os resultados esperados, indicando haver algum outro problema com a metodologia utilizada.

Numa observação mais criteriosa, verificou-se que, no momento da agitação do fungo e do arroz nos sacos plásticos, uma grande quantidade de material fúngico permanecia aderida à parede dos mesmos, e, portanto, havia grande perda do inóculo que efetivamente permanecia nos grãos, impossibilitando a infecção dos insetos. Outro problema, principalmente relacionado com as dosagens maiores, foi constatado durante a avaliação da mortalidade, quando diariamente o material (arroz + fungo + insetos) era transferido dos recipientes para uma pequena bandeja plástica, para permitir a visualização dos insetos vivos e mortos diariamente. Dessa maneira, conídios do fungo se desprendiam, ficando suspensos no ar, fato que não ocorria na etapa anterior, onde o inóculo era distribuído diretamente na superfície do corpo dos insetos utilizados.

Após a constatação desses problemas, optou-se por uma modificação na metodologia, utilizando-se recipientes plásticos maiores (250 ml de volume), que permitiram a colocação dos 100 g de grãos por recipiente, sem a necessidade da agitação nos sacos plásticos e posterior divisão do material por 5 recipientes, como

utilizado anteriormente. Assim, o fungo foi adicionado nas dosagens estudadas em cada recipiente, sendo um total de 5 repetições por tratamento. A avaliação da mortalidade foi feita somente após 10 dias, evitando-se a retirada do material e a perda de inóculo no ar.

Foram realizados bioensaios com os isolados inoculados em grãos de arroz beneficiado, avaliando-se seu efeito sobre a mortalidade de *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica*. As dosagens testadas foram de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 g de conídios/100 g de grãos, sendo cada teste acompanhado por 2 tratamentos testemunha (sem aplicação do fungo), totalizando 9 tratamentos, com 5 repetições cada, tendo 20 insetos por repetição.

A avaliação da mortalidade foi feita 10 dias após a inoculação. Os insetos mortos foram lavados com álcool puro e água destilada, para desinfestação superficial, e, em seguida, acondicionados em placas plásticas para individualização e mantidos em câmara úmida para confirmação da mortalidade, através da conidiogênese nos cadáveres, como já descrito anteriormente.

Foi feita a análise de Probit para a determinação da dosagem mais adequada, para aplicação do fungo sobre os grãos, bem como a comparação entre as médias de mortalidade total confirmada após 10 dias, por meio de análise de variância e teste de Tukey.

3.6 - Estudos de aplicação dos conídios em formulações

Foi realizado um ensaio com a finalidade de verificar a eficiência da adição de alguns inertes aos conídios do fungo *B. bassiana*, em comparação com o fungo puro.

Para tanto, foram utilizados os inertes leucita, pirofilito, bentonita, caulim e talco, de composição granulométrica predominantemente argilosa (FERNANDES, 1990) em proporção de 1:1 em peso, com um dos isolados selecionados anteriormente (476), na dosagem de 0.5 g de fungo/100 g de grãos.

Os inertes foram misturados ao patógeno por meio de agitação manual em tubo plástico utilizado em centrífugas, por um período de 5 minutos. Em seguida, 1 g de cada formulação (0,5 g do fungo:0,5 g do inerte) foi adicionado aos frascos contendo 100 g de grãos de arroz beneficiado, sendo misturados manualmente por 1 minuto.

Os frascos foram infestados com 20 adultos de *S. oryzae* por repetição. Foi também conduzido o tratamento com o fungo puro, na mesma dosagem, e um tratamento testemunha (somente alimento), sendo cada tratamento constituído de 5 repetições.

Avaliou-se a mortalidade dos insetos após 10

dias, sendo que, ao final deste período, foi feita uma reinfestação com igual número de insetos ao utilizado anteriormente, calculando-se a mortalidade dos mesmos após um segundo período de 10 dias, sendo este procedimento repetido novamente, totalizando um período de avaliação de 30 dias com 2 reinfestações.

Também, na ocasião das avaliações, procedeu-se à determinação da viabilidade das formulações, por meio de plaqueamento de suspensões de conídios obtidas a partir de grãos de arroz inoculados de cada tratamento, em meio de cultura BDA. Observou-se a germinação dos conídios do fungo após 20 horas a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, comparando-se os valores obtidos à viabilidade inicial das formulações.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com teste de Tukey para comparação entre as médias de mortalidade e viabilidade das formulações.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Seleção dos isolados mais virulentos

Pode-se observar que, para *R. dominica*, a maioria dos isolados testados causou mortalidades superiores a 70 %, sendo que com relação a *S. oryzae* e *S. zeamais* houve uma grande variação nas mortalidades obtidas, encontrando-se alguns isolados que foram totalmente ineficientes para essas pragas (Tabela 2 e Figura 4).

Como regra geral, os isolados de *M. anisopliae* foram menos eficientes, resultando em mortalidades baixas, quando comparadas com aquelas obtidas com os isolados de *B. bassiana*.

FERRON & ROBERT (1975), trabalhando com o caruncho-do-feijão *A. obtectus*, compararam a suscetibilidade desta praga a diferentes isolados de fungos, entre eles *B. bassiana*, *B. tenella*, *M. anisopliae* e *P. fumoso-roseus*, verificando também maior eficiência dos isolados de *B. bassiana*, quando comparados aos de *M. anisopliae*.

RODRIGUES & PRATISSOLI (1990) compararam a

eficiência de *B. brongniartii* e *M. anisopliae* para o controle de *S. zeamais* e *A. obtectus*, também encontrando maior eficiência de *B. brongniartii*, principalmente com relação ao caruncho-do-feijão.

LOURENÇÃO et al. (1993) obtiveram, com relação ao gorgulho *S. zeamais*, resultados ainda mais expressivos, mostrando as diferenças entre os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Numa primeira avaliação, realizada 7 dias após a infestação, *B. bassiana* promoveu mortalidades acima de 75%, enquanto que *M. anisopliae* causou mortalidades de 10 e 20%, nas duas dosagens utilizadas (1,25 e 2,50 g de arroz + fungo). Nas avaliações posteriores, *M. anisopliae* chegou a causar 86,5% de mortalidade, mas somente aos 28 dias após a infestação, o que caracteriza este patógeno como de ação bem mais lenta.

As diferenças de mortalidade observadas mostram a importância desta fase inicial de seleção, onde pode-se contar com uma variabilidade considerável entre os isolados. Segundo PACOLLA-MEIRELLES & AZEVEDO (1990), para que um programa de controle biológico possa ser o mais eficiente possível, é necessário o uso de linhagens apropriadas que possuam qualidades satisfatórias, que podem ser encontradas naturalmente ou obtidas através de mutação com agentes químicos ou físicos. Os autores averiguaram a extensão da variabilidade natural para características de

interesse no controle biológico em 5 isolados de *B. bassiana* oriundos de diferentes regiões brasileiras, concluindo que a variabilidade natural é bastante ampla, podendo ser aproveitada na condução de um programa sem a necessidade de indução de mutação.

A fase de "screening", concluída por meio destes testes, constitui-se em uma etapa indispensável na seleção dos isolados mais eficientes. Nessa fase foi possível descartar materiais pouco patogênicos ou com baixa capacidade de penetração e germinação.

Os isolados selecionados nesta fase foram: 476, 484, 499, 529, 532, 548, 572, 573, 604 e 643 (isolados de *B. bassiana*). O critério utilizado para a seleção destes isolados procurou levar em conta as mortalidades obtidas com relação às três pragas, selecionando-se os isolados que promoveram mortalidades próximas a 100 %.

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade total confirmada de *S. oryzae*, *S. zeamais* e *R. dominica* após 10 dias de inoculação com isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Isolado (nº)	<i>S.oryzae</i>	<i>S.zeamais</i>	<i>R.dominica</i>
E-9 *	13,7	58,6	73,9
PL-10 *	0,0	30,0	56,6
PL-42 *	0,0	23,3	76,6
PL-43 *	0,0	10,0	60,0
61	6,6	3,3	80,0
104 *	37,9	44,8	86,9
196	72,4	43,3	89,3
197	80,0	33,3	82,1
255 *	0,0	34,4	86,9
256	86,2	63,3	100,0
268	76,6	43,3	40,0
292	44,8	6,6	35,7
319 *	10,3	44,8	60,8
341	76,6	63,3	100,0
353	96,6	43,3	96,0
428	56,6	30,0	30,0
447	72,4	73,3	90,0
457	34,5	23,3	89,3
458	63,3	46,6	80,0
476	100,0	73,3	100,0
484	100,0	56,6	100,0
499	96,3	83,3	100,0
500	90,0	53,3	96,0
501	83,3	36,6	75,0
524	96,6	53,3	95,0
529	93,3	60,0	100,0
532	96,5	76,6	100,0
534	56,6	63,3	92,0
536	55,1	63,3	93,3
538	36,6	73,3	100,0
542	60,0	33,3	60,0
543	96,3	60,0	100,0
544	43,3	56,6	88,0
548	92,6	86,6	100,0
549	86,2	63,3	96,6
550	55,1	43,3	100,0
554	10,3	76,6	92,3
558	86,2	93,3	92,3
562	44,8	93,3	84,6

Isolado (nº)	<i>S.oryzae</i>	<i>S.zeamais</i>	<i>R.dominica</i>
569	83,3	93,3	86,6
571	73,3	90,0	90,0
572	76,6	100,0	96,6
573	93,3	96,6	93,3
579	80,0	90,0	90,0
589	85,2	70,0	100,0
600	0,0	73,3	80,0
601	86,6	83,3	93,3
602	0,0	36,6	50,0
604	33,3	100,0	100,0
606	46,6	86,6	93,3
607	10,0	3,3	28,0
617	86,6	66,6	92,8
618	55,2	43,3	92,8
619	76,6	53,3	92,8
620	72,4	50,0	96,4
641	96,5	70,0	100,0
643	96,5	86,6	100,0
674	44,8	63,3	100,0
695	37,9	13,3	50,0
791	55,8	89,6	95,6
798 *	0,0	16,6	84,6
860 *	0,0	0,0	86,9
865 *	0,0	3,3	20,0
866 *	0,0	50,0	23,2
940	80,0	33,3	75,0
943	83,3	63,3	89,3
969	50,0	56,6	100,0
986	56,6	66,6	100,0
987	80,0	86,6	96,6
988	60,0	80,0	100,0
1003	43,3	46,6	93,3
1010	46,6	48,3	100,0

* = isolados de *M. anisopliae*

Figura 4. Distribuição dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em faixas de porcentagem de mortalidade obtidas sobre as três pragas estudadas.

4.2 - Avaliação da eficiência dos isolados selecionados no "screening"

4.2.1 - Estabelecimento da dosagem padrão

A dosagem de 0,01 g de fungo/50 insetos foi eficiente para as três pragas estudadas, causando cerca de 100 % de mortalidade dos insetos após dez dias de avaliação (Tabela 3), sendo portanto, a mais indicada para a realização dos testes de comparação entre os isolados selecionados anteriormente.

Tabela 3. Valores de DL90 dos isolados estudados e equações obtidas pela análise de Probit no estabelecimento da dosagem padrão (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Praga/isolado	DL ₉₀ (g)	Equação
S.oryzae/476	0,0104	$Y=8,04908+0,88874.\log X$
S.zeamais/572	0,0090	$Y=7,90982+0,79424.\log X$
R.dominica/643	0,0087	$Y=7,97172+0,81803.\log X$

4.2.2 - Bioensaios com os isolados selecionados

Os resultados obtidos nos testes com os dez isolados selecionados sobre as três pragas estudadas encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Porcentagens médias de mortalidade após dez dias e valores de TL₅₀ para *S. oryzae* quando inoculado com *B. bassiana* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Isolado/tratamento	% mortalidade		TL ₅₀ (dias)
Testemunha	0	a	-
476	90,0	b	5,46(5,13;5,80)
484	62,0	b	7,62(6,88;8,44)
499	70,0	b	6,50(5,98;7,08)
529	54,0	b	8,75(7,69;9,96)
532	78,0	b	6,31(5,77;6,90)
548	80,0	b	6,00(5,60;6,44)
572	50,0	b	8,74(7,84;9,74)
573	54,0	b	8,04(6,84;9,45)
604	86,0	b	5,71(5,34;6,09)
643	80,0	b	6,36(5,63;7,17)

CV = 34,875 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo teste de Tukey.

Com relação aos resultados obtidos para *S. oryzae*, foi possível observar que o isolado 476, utilizado para o estabelecimento da dosagem padrão, comportou-se como o mais virulento para esta praga, quando comparado aos

demais, apresentando um menor valor de TL₅₀. No entanto, quando foram comparadas as mortalidades médias totais, todos os isolados apresentaram comportamento semelhante (Tabela 4). Não foi possível uma discriminação mais rigorosa entre os isolados testados através da análise das porcentagens de mortalidade obtidas. Por outro lado, os valores obtidos por meio da análise de Probit possibilitaram perfeitamente a separação entre os isolados mais e menos eficientes.

Tabela 5. Porcentagens médias de mortalidade após dez dias e valores de TL₅₀ para *S. zeamais* quando inoculado com *B. bassiana* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Isolado/tratamento	% mortalidade	TL ₅₀ (dias)
Testemunha	0 a	-
476	46,0 b	9,73(8,27;11,45)
484	94,0 c	4,58(4,12;5,09)
499	42,0 b	10,16(8,92;11,58)
529	98,0 c	4,55(4,15;4,99)
532	44,0 b	9,80(8,55;11,23)
548	48,0 b	9,32(8,28;10,50)
572	70,0 b	6,70(5,95;7,56)
573	92,0 c	4,70(4,20;5,26)
604	98,0 c	4,28(3,85;4,75)
643	94,0 c	4,31(3,77;4,94)

CV = 19,268 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo teste de Tukey.

No caso de *S. zeamais*, alguns isolados foram superiores ao isolado 572 (utilizado para a determinação da dosagem padrão), sendo mais eficiente o isolado 604, seguido de um grupo formado pelos isolados 484, 529, 573 e 643 (Tabela 5).

Tabela 6. Porcentagens médias de mortalidade após dez dias e valores de TL₅₀ para *R. dominica* quando inoculado com *B. bassiana* (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Isolado/tratamento	% mortalidade		TL ₅₀ (dias)
Testemunha	0	a	-
476	100,0	b	2,64(1,58;4,42)
484	98,0	b	3,17(2,59;3,89)
499	100,0	b	2,58(2,49;2,68)
529	100,0	b	2,82(2,46;3,24)
532	100,0	b	2,68(1,87;3,84)
548	100,0	b	-
572	88,0	b	2,80(1,62;4,81)
573	96,0	b	2,84(2,18;3,70)
604	98,0	b	2,67(1,87;3,81)
643	98,0	b	2,78(2,03;3,81)

CV = 9.945 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo teste de Tukey.

Para *R. dominica*, observou-se um comportamento muito semelhante de vários isolados, todos causando mortalidades próximas a 100 %, confirmando a alta suscetibilidade desta praga ao patógeno, já evidenciada nos bioensaios para a seleção inicial dos patógenos (Tabela 6).

Sendo assim, é possível que qualquer isolado que seja selecionado para as demais pragas leve ao controle de *R. dominica*. Pode-se considerar que os isolados 476 para *S. oryzae* e 604 para *S. zeamais* são os mais favoráveis para a continuidade da pesquisa em sua etapa seguinte.

4.3 - Estudos de dosagens a serem aplicadas nos grãos

As equações obtidas por meio da análise de Probit, referentes aos seis bioensaios realizados encontram-se na Tabela 7. As Tabelas de 8 a 13 contêm as porcentagens de mortalidades confirmadas 10 dias após a inoculação dos insetos com os isolados 476 e 604.

Tabela 7. Valores de DL₅₀ e equações obtidas pela análise de Probit para o fungo *B. bassiana*, isolados 476 e 604, sobre as três pragas estudadas (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Praga/isolado	DL ₅₀ (g fungo/100 g grãos)	Equação
<i>S. oryzae</i> /476	0,0678(0,0470;0,0979)	Y=6,12215+0,96004.logX
<i>S. oryzae</i> /604	0,0915(0,0511;0,1638)	Y=5,87411+0,84160.logX
<i>S. zeamais</i> /476	0,0177(0,0120;0,0261)	Y=6,17197+0,66895.logX
<i>S. zeamais</i> /604	0,0067(0,0039;0,0115)	Y=7,16350+0,99607.logX
<i>R. dominica</i> /476	0,0004(0,0001;0,0023)	Y=8,38693+0,99967.logX
<i>R. dominica</i> /604	0,0013(0,0006;0,0028)	Y=7,86678+0,99882.logX

Verifica-se, com relação a *S. oryzae*, que houve uma maior eficiência do isolado 476, sendo obtida uma DL₅₀ menor que aquela obtida para o isolado 604. Não ocorreu, por outro lado, diferença significativa entre os dois isolados, observada por meio dos intervalos de confiança obtidos, que apresentam sobreposição de valores.

Com relação a *S. zeamais*, houve maior eficiência do isolado 604, observando-se diferença significativa nos intervalos de confiança obtidos, indicando que o isolado 604, a uma dosagem menor, provoca a morte do mesmo número de insetos que o isolado 476.

Para *R. dominica*, observou-se uma maior sensibilidade deste inseto ao isolado 476, sendo também mais suscetível ao isolado 604 que as outras duas espécies.

Tabela 8. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. oryzae* quando inoculados com o isolado 476 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Dosagem (g fungo/100 g grãos)	% mortalidade	Tukey 5%
Test 1	0	a
Test 2	0	a
0.001	7.0	ab
0.005	10.0	ab
0.01	22.0	b
0.05	44.0	c
0.1	52.0	c
0.5	84.0	d
1.0	87.0	d

CV = 25,518 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 9. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. oryzae* quando inoculados com o isolado 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Dosagem (g fungo/100 g grãos)	% mortalidade	Tukey 5%
Test 1	0	a
Test 2	0	a
0.001	7.0	a
0.005	17.0	a
0.01	10.0	a
0.05	44.0	b
0.1	55.0	b
0.5	77.0	c
1.0	77.0	c

CV = 25.551 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Comparando-se as porcentagens de mortalidade obtidas com a aplicação dos isolados 476 e 604 sobre *S. oryzae*, nota-se a confirmação dos resultados obtidos pela análise de Probit, com maior eficiência do isolado 476. Pode-se distinguir, no caso dos dois isolados, uma melhor discriminação nas dosagens de 0.5 e 1.0 g de fungo/100 g de grãos, que causaram as maiores mortalidades após 10 dias da inoculação. Assim, a dosagem de 0.5 g de fungo/100 g de grãos pode ser considerada como o mínimo indicado para o controle desta praga por meio da utilização destes isolados (Figura 5).

Figura 5. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. oryzae* em grãos inoculados com os isolados 476 e 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens estudadas.

Tabela 10. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. zeamais* quando inoculados com o isolado 476 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Dosagem (g fungo/100 g grãos)	% mortalidade	Tukey 5%
Test 1	8.0	a
Test 2	8.0	a
0.001	26.0	ab
0.005	41.0	b
0.01	45.0	b
0.05	66.0	c
0.1	78.0	cd
0.5	83.0	cd
1.0	87.0	d

CV = 20.390 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 11. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. zeamais* quando inoculados com o isolado 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Dosagem (g fungo/100 g grãos)	% mortalidade	Tukey 5%
Test 1	8,0	a
Test 2	8.0	a
0.001	29.0	b
0,005	54.0	c
0.01	56,0	c
0,05	78,0	d
0,1	85.0	de
0,5	99.0	e
1,0	100,0	e

CV = 15,270 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Com relação a *S. zeamais*, tanto para o isolado 476 quanto para o isolado 604, observou-se uma melhor discriminação a partir da dosagem de 0,1 g de fungo/100 g de grãos, indicando que esta dosagem pode ser considerada como o mínimo necessário para o controle desta praga com a utilização do fungo (Figura 6).

Figura 6. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *S. zeamais* em grãos inoculados com os isolados 476 e 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens estudadas.

Tabela 12. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *R. dominica* quando inoculados com o isolado 476 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Dosagem (g fungo/100 g grãos)	% mortalidade	Tukey 5%
Test 1	0	a
Test 2	0	a
0,001	69,0	b
0,005	75,0	b
0,01	99,0	c
0,05	98,0	c
0,1	99,0	c
0,5	100,0	c
1,0	100,0	c

CV = 7,738 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 13. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *R. dominica* quando inoculados com o isolado 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens, 10 dias após a inoculação (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Dosagem (g fungo/100 g grãos)	% mortalidade	Tukey 5%
Test 1	0	a
Test 2	0	a
0,001	49,0	b
0,005	68,0	c
0,01	80,0	d
0,05	90,0	de
0,1	100,0	e
0,5	100,0	e
1,0	100,0	e

CV = 7,666 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Para *R. dominica*, pode-se afirmar que ocorreu uma melhor discriminação a partir da dosagem de 0,01 g de fungo/100 g de grãos com relação ao isolado 476 (Tabela 12). Já com relação ao isolado 604, as maiores mortalidades são obtidas a partir da dosagem de 0,05 g de fungo/100 g de grãos. Assim, confirmou-se o que foi discutido anteriormente, com relação à maior suscetibilidade de *R. dominica* aos isolados aplicados quando comparada às outras duas pragas estudadas (Figura 7).

Figura 7. Porcentagens médias de mortalidade de adultos de *R. dominica* em grãos inoculados com os isolados 476 e 604 de *B. bassiana* nas diferentes dosagens estudadas.

De maneira geral, observou-se, por meio dos bioensaios conduzidos, que as dosagens a serem aplicadas na massa de grãos foram bem maiores que aquelas obtidas na etapa anterior, quando os conídios eram aplicados diretamente sobre os insetos. Este fato, de certa forma, ressalta a importância da determinação destas dosagens, com reflexos na aplicação correta do material, quando for utilizado em maior escala, bem como da necessidade do estudo de algum tipo de formulação, que permita melhor distribuição do fungo nos grãos, levando a resultados mais eficientes no controle dessas pragas.

4.4 - Estudos de aplicação do fungo em formulações

Foi possível observar que não ocorreu efeito muito pronunciado da adição dos diferentes inertes ao patógeno (Tabela 14). No decorrer do período de avaliação notou-se, porém, que a patogenicidade do fungo diminuiu, ainda que muito lentamente, e também de forma não muito diferenciada com relação aos inertes comparados com o fungo puro.

Apenas o inerte pirofilito mostrou-se menos adequado, apresentando diferença significativa de fungo puro após 20 dias de inoculação e das formulações com

bentonita e talco após 30 dias.

Tabela 14. Porcentagens de mortalidade total confirmada de *S. oryzae* aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação do fungo *B. bassiana* puro e em diferentes formulações (Temperatura=26±0,5°C; Umidade Relativa=70±10%; Fotofase=12 horas).

Tratamento	10 dias	20 dias	30 dias
Testemunha	7,6 a	0,8 a	0 a
Fungo	36,0 b	34,0 c	28,8 bc
Bentonita + fungo	35,6 b	31,2 bc	32,4 c
Leucita + fungo	29,6 b	30,4 bc	29,6 bc
Caulim + fungo	34,4 b	30,4 bc	29,2 bc
Talco + fungo	34,0 b	32,4 bc	32,4 c
Pirofilito + fungo	30,8 b	27,2 b	22,8 b

CV=11,405% CV=11,531% CV=16,816%

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Com relação à viabilidade do patógeno, esta se manteve durante todo o período de avaliação, sendo verificado o valor inicial de 100 % de viabilidade para o fungo puro e as formulações, não ocorrendo decréscimo deste valor até o final do experimento. FERNANDES (1991), trabalhando com o controle de cupins de montículo *Cornitermes cumulans*, obteve viabilidades inferiores a 80 % para *B. bassiana* e *M. anisopliae* somente a partir de 120 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Este fato sugere que se faz necessária uma observação mais prolongada

do material inoculado com o fungo, acompanhada de um maior número de reinfestações, para se ter melhor idéia da persistência e do efeito protetor do patógeno no meio em estudo, confirmando-se os valores obtidos por RODRIGUES & PRATISSOLI (1990). Também FERNANDES (1991) não encontrou efeito dos inertes talco, caulim e leucita, não havendo aumento da longevidade dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sob condição ambiente em laboratório, nem aumento da eficiência de controle de colônias de cupins no campo. Por outro lado, uma observação interessante pode ser feita com relação à utilização desses inertes em formulações para uso em grãos armazenados. Foi possível observar uma melhor distribuição do patógeno nos grãos, ficando menor número de grânulos residuais, no fundo dos recipientes, quando comparados ao fungo puro. Além disso, observou-se que os insetos, ao serem colocados em contato com o material inoculado, logo penetravam na massa de grãos, o que não ocorria com o fungo puro, onde os insetos pareciam detectar, ou pelo menos investigar a existência de alguma substância estranha ao meio. Isso indica que estudos posteriores devam ser realizados, visando encontrar possíveis efeitos de atração de materiais utilizados nas formulações, bem como outros tipos de inertes, como por exemplo óleos, que permitam outra via de aplicação do patógeno nos grãos.

5 - CONCLUSÕES

Existe grande variabilidade entre os isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* oriundos de diversas regiões e hospedeiros, quanto ao caráter patogenicidade, com relação às pragas estudadas.

As espécies *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica* são suscetíveis aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Os isolados do fungo *B. bassiana* são mais eficientes que os isolados de *M. anisopliae* com relação às três espécies de pragas de grãos armazenados.

Os isolados de *B. bassiana* selecionados (476 e 604) são os mais adequados para o controle de *S. oryzae* e *S. zeamais*, respectivamente, sendo ambos eficientes também para o controle de *R. dominica* nas dosagens determinadas.

A adição de inertes aos conídios de *B. bassiana* não favorece a eficiência do patógeno para o controle de *S. oryzae* em relação à utilização do fungo puro.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.A. & MATIOLI, J.C. Ocorrência de *Choetorpila elegans* Westwood, 1874 (Hym., Pteromalidae) como parasito de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763)(Col., Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, **13**: 107-15. 1984.

ALVES, S.B. Caracterização, padronização e produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorok. Piracicaba, 1982. 95 p. (Livre-Docência-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

ALVES, S.B. Patologia geral. In: ALVES, S.B., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Manole, 1986b. p. 3-70.

ALVES, S.B. Métodos utilizados em patologia e controle microbiano. In: ALVES, S.B., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Manole, 1986a. p. 237-77.

ALVES, S.B. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo. Manole, 1986c. p. 311-23.

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.

AMARAL FILHO, B.F.do. Estudos biológicos e patológicos de dois piralídeos pragas de produtos armazenados. Campinas, 1986. 167 p. (Doutorado-Universidade Estadual de Campinas).

ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. **O caupi no Brasil**. Brasília. IITA, EMBRAPA. 1988. 722 p.

ARBOGAST, R.T. Suppression of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Cucujidae) on shelled corn by the predator *Xylocoris flavipes* (Reuter) (Hemiptera, Anthocoridae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, Athens, 11: 67-71, 1976.

ARBOGAST, R.T. & MULLEN, M.A. Interaction of maize weevil (Coleoptera: Curculionidae) and parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) in a small bulk of stored corn. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 83(6): 2462-8, 1990.

ARTHUR, V. Influência da temperatura antes e após a radiação gama em *Zabrotes subfasciatus* (Boh., 1833)(Coleoptera, Bruchidae). Piracicaba, 1981. 69 p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

BANKS, H.J.; ANNIS, P.C.; RIGBY, G.R. Controlled atmosphere storage of grain: the known and the future. In: FLEURAT-LESSARD, F. & DUCON, P. INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTION, 5., Bordeaux, 1990. **Proceedings**. Bordeaux, 1990.. 695-706.

BARE, C.D. Some natural enemies of stored-tobacco insects with biological notes. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 35: 185-9, 1942.

- BITRAN, F.A. & MELLO, E.J. Prejuizos causados pelo gorgulho *Sitophilus zeamais* Mots. em milho armazenado. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO, 9., Recife, 1972. **Anais.** Recife, SUDENE, 1972. p. 102-5.
- CAMPOS, T.B. & BITRAN, F.A. Avaliação experimental de prejuizos ocasionados por *Sitophilus zeamais* Motschulsky em milho ensacado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 3., Maceió. **Resumos.** Maceió, SEB, 1976. p. 121.
- CHAMP, B.R. & DYTE, C.E. Report of the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. Rome, FAO, 1976. 297 p. (Plant-Production and Protection Series, 5).
- CLINE, L.D.; PRESS, J.W.; FLAHERTY, B.R. Supression on the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) inside and outside of berlap, moven polypropylen, and cotton bags by the parasitic wasp, *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 78: 835-8. 1985.

DE BACH, P. El alcance del control biologico. In: DE BACH, P. **Control biologico de las plagas de insectos y malas hierbas**. Mexico, Ed. Continental, 1964. 949 p.

DOMARCO, R.E. Influência da taxa de radiação gama sobre a radiosensibilidade de cinco espécies de insetos. Piracicaba, 1977. 68 p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

DUNKEL, F.V. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 7(3): 227-44, 1988.

DUNKEL, F.V. The stored grain ecosystem: a global perspective. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 28(2): 73-87, 1992.

DUNKEL, F.V. & READ, N.R. Sorbic acid as a long-term protectant in stored corn. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 79: 805-12, 1986.

FAVERO, S.: SALGADO, L.O.: VILELA, E.F.; PILLI, R.A.
Atração de *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE) ao (4SR, 5RS)-5-hidroxi-4-metil-3-
heptanona, forma racêmica do feromônio sintético de
agregação sitofilure. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE
ENTOMOLOGIA, 14.. Piracicaba, 1993. **Resumos**. Piracicaba,
SEB, 1993. p. 98.

FERNANDES, P.M. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans*
(Kollar, 1832)(Isoptera: Termitidae) utilizando
Beauveria bassiana (Bals.)Vuill. e *Metarhizium*
anisopliae (Metsch.)Sorok. Piracicaba, 1991. 114 p.
(Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz"/USP)

FERNANDES, P.M.: ALBERTONI, M.R.: DAOUST, T.A.
Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* ao caruncho
Callosobruchus maculatus do caupi (*Vigna unguiculata*).
Boletim do Grupo de Pesquisas em Controle Biológico,
Brasília, 4:17-19, 1983.

FERRON, P. Influence of relative humidity on the
development of fungal infection caused by *Beauveria*
bassiana in imagines of *Acanthoscelides obtectus*.
Entomophaga, Paris, 22(4): 393-6, 1977.

FERRON, P. & ROBERT, P.H. Virulence of entomopathogenic fungi for the adults of *Acanthoscelides obtectus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **25**: 379-88, 1975.

FRYDOCVA, B.; VERNER, P.H.; BARTOS, J. The comparative effectiveness of two biopreparations based on the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*, especially their effects on storage pests. **Sbornik Vysoke Skoly Zemedelske v Praze, Fakulta Agronomicka, Rada a Rostlinna Vyroba**, Prague, **50**: 247-64, 1989. Apud **Review of Agricultural Entomology**, Wallingford, **79(2)**: 223, fev. 1991. (Resumo)

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GEORGE, C.R. Irreversible malnutrition in *Tribolium castaneum* attributable to parasitization by *Nosema whitei*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, **8**:227-8, 1972.

- GHOSH, S. & SAHA, K. Experimental infection of *Nosema* sp. Ghose in an unnatural host *Lasioderma serricorne*. **The Journal of Protozoology**, Lawrence, 39(3): 410-2, 1992.
- HAINES, C.P. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. III. The use of predators and parasites. **Tropical Stored Products Information**, Slough, 48: 17- 25, 1984.
- HASSEL, M.P.; LESSELLS, C.M.; McGAVIN, G.C. Inverse density dependent parasitism in a patchy environment: a laboratory system. **Ecological Entomology**, Oxford, 10: 393-402, 1985.
- HLUCHY, M. & SAMSINAKOVA, A. Comparative study on the susceptibility of adult *Sitophilus granarius* (L.)(Coleoptera:Curculionidae) and larval *Galleria mellonella* (L.)(Lepidoptera:Pyralidae) to the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 25(2): 61-4, 1989.

- HUNTER, D.K.; COLZIER, S.S.; HOFFMANN, D.F. The effect of a granulosis virus on *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) infestations occurring in stored raisins. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 15: 65-9, 1979.
- IGNOFFO, C.M. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, 217: 141-64, 1973.
- JASSIM, H.K.; ABDULLAH, L.M.; ABD-AL-AHAD, I. Determination of the exact concentration of *Beauveria bassiana* (Vuill.) to control the larvae of the fig moth, *Ephestia cautella* (Walk.) on stored dates in Iraq. **Arabian Journal of Plant Protection**, 6(1): 44-5, 1988. Apud **Review of Applied Entomology**, Series A, Walingford, 77(6): 458, jun. 1989. (Resumo)
- KELLEN, W.R. & LINDEGREN, J.E. Modes of transmission of *Nosema plodiae* Kellen and Lindgren, a pathogen of *Plodia interpunctella* (Hübner). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 7: 31-4, 1971.

KHAN, A.R. & SELMAN, B.J. On the mortality of *Tribolium castaneum* adults treated sublethally as larvae with pirimiphos methyl, *Nosema whitei* and primiphos methyl - *N. whitei* doses. **Entomophaga**, Paris, 33(3): 377-80, 1988.

KHAN, A.R. & SELMAN, B.J. *Nosema* spp. (Microspora: Microsporida: Nosematidae) of stand-product Coleoptera and their potential as microbial control agents. **Agricultural Zoology Reviews**, Ames, 3: 193-223, 1989.

KISTLER, R.A. Host-age structure and parasitism in a laboratory system of two hymenopterous parasitoids and larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Environmental Entomology**, College Park, 14: 507-11, 1985.

KRAMER, K.J.; HENDRICKS, L.H.; WOJCIAK, J.H.; FYLER, J. Evaluation of fenoxycarb, *Bacillus thuringiensis*, and malation as grain protectants in small bins. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 78(3): 632-6, 1985.

- LEVIVELDT, B.; LABORIUS, G.A.; SCHULZ, F.A. The distribution of *Mattesia* sp. (Neogregarinida: Ophryocystidae), a pathogen of *Prostephanus truncatus* (Horn)(Coleoptera: Bostrichidae) in Togo. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 24(4): 241-3, 1988.
- LINK, D. & ROSSETTO, C.J. Relação entre fissura na casca do arroz e infestação de *Sitotroga cerealella* (Oliver, 1819) (Lepidoptera, Gelechiidae). **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, 15(2): 225-7, 1972.
- LINK, D.; ROSSETTO, C.J.; IGUE, T. Resistência relativa de variedades de arroz em casca ao ataque de *Sitophilus oryzae* (Linée, 1763), *S. zeamais* Motschulsky, 1885 e *Sitotroga cerealella* (Oliver, 1819) em condições de laboratório. Santa Maria, UFSM, 1971. 70 p. (Boletim Técnico, 2).
- LOURENÇÃO, A.L.; KOMATSU, S.; ALVES, S.B. Aplicação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e pirimifós-metil em milho para controle de *Sitophilus zeamais*. **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, 18, 1993. (no prelo)

MARDAN, A.H. & HAREIN, P.K. Susceptibility of a malation-resistant strain of indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 77(5): 1260-3, 1984.

McGAUGHEY, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, 229(4709): 193-5, 1985.

McGAUGHEY, W.H. & BEEMAN, R.W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 81(1): 28-33, 1988.

McMILLIAN, W.W.; WINDSTROM, N.W.; WILSON, D.M. Rearing the maize weevil on maize genotypes when aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates were present. **Environmental Entomology**, College Park, 10(5): 760-2, 1981.

MUNRO, J.W. **Pests of stored products**. London, Hutchinson, 1966. 234 p.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. & AZEVEDO, J.L. Natural variability in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, **33**(3): 657-72, 1990.

PACHECO, I.A.; SARTORI, M.R.; TAYLOR, R.W.D. Levantamento de resistência de insetos-pragas de grãos armazenados à fosfina, no Estado de São Paulo. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **20**(2): 144-54, 1990.

PRESS, J.W.; FLAHERTY, B.R.; ARBOGAST, R.T. Control of the red flow beetle, *Tribolium castaneum*, in a warehouse by a predaceous bug, *Xylocoris flavipes*. **Journal of Georgia Entomological Society**, Athens, **10**: 76-8, 1975.

PURRINI, K. & KEIL, H. *Ascogregarina bostrichidorum* n.sp. (Lecudinidae, Eugregarinida), a new gregarine parasitizing the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn (1878) (Bostrichidae: Coleoptera). **Archiv fur Protistenkunde**, Jena, **137**(2): 165-171, 1989.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 603 p.

- RABINDRA, R.J.; JAYARAJ, S.; BALASUBRAMANIAN, M.
Farinocystis tribolii-induced susceptibility to some insecticides in *Tribolium castaneum* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 52(3): 389-92, 1988.
- REES, D.P. The effect of *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae) on three species of storage Bostrichidae infesting shelled maize. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 27(1): 83-6, 1991.
- RODRIGUES, C. & PRATISSOLI, D. Patogenicidade de *Beauveria brongniarti* (Sacc.) Petch. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e seu efeito sobre o gorgulho do milho e caruncho do feijão. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, 19(2): 301-6, 1990.
- ROSSETTO, C.J. Sugestões para o armazenamento de grãos no Brasil. **O Agrônomo**, Campinas, 18(9/10): 38-51, 1966.
- ROSSETTO, C.J.; PAINTER, R.H.; WILBUR, D. Resistência de variedades de arroz em casca a *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Fitotecnia Latinoamericana**, San Jose, 9(1): 10-8, 1973.

RUHNKE, T.R. & JANOVY JR., J. The site specificity of two species of Gregarina in *Tenebrio molitor* larvae. **The Journal of Protozoology**, Lawrence, 36(4): 428-30, 1989.

SAIK, J.E.; LACEY, L.A.; LACEY, C.M. Safety of microbial insecticides to vertebrates - domestic animals and wild life. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.N. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 115-132.

SALAMA, H.S. & ABDEL-RAZEK, A. Effect of different kinds of food on susceptibility of some stored products insects to *Bacillllus thuringiensis*. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, 113(1): 107-10, 1992.

SALAMA, H.S.; EL-MOURSY, A.; ABOUL-ELA, R.; ABDEL-RAZEK, A. Potency of different varieties of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) against some lepidopterous stored product pests. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, 112(1): 19-26, 1991.

SALGADO, L.O. & FAVERO, S. Atracção de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) ao feromônio sintético de agregação demonstrada em olfatômetro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14.. Piracicaba, 1993. **Resumos**. Piracicaba, SEB, 1993. p. 84.

SARTORI, M.R.; PACHECO, I.A.; IADEROSA, M.; TAYLOR, R.W.D. Ocorrência e especificidade de resistência ao inseticida malation em insetos-pragas de grãos armazenados no Estado de São Paulo. **Coletânea do ITAL**, Campinas, 20(2): 194-209, 1990.

SEARLE, T. & DOBERSKI, J. An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent, for *Oryzaephilus surinamensis*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 20(1): 17-24, 1984.

SIEGEL, J.P. & SHADDUCK, J.A. Safety of microbial insecticide to vertebrates - humans. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.N. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 101-13.

- SILVA, A.C. da; ARTHUR, V.; WALDER, J.M.M.; DOMARCO, R.E.
Influência da radiação gama do Cobalto-60 na viabilidade de ovos de *Anagasta kuhniella* (Zeller, 1879). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13., Recife, 1991. **Resumos**. Recife, SEB, 1991. p. 333.
- SINHA, K.K. & SINHA, A.K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 27(1): 65-8, 1991.
- SRINATH, D.; RAGUNATHAN, A.N.; MAJUMDER, S. Influence of some *Aspergillus* species on the population of *Sitophilus oryzae* L.(Coleoptera:Curculionidae). **Current Science**, Bangalore, 42: 683-4, 1973.
- STEINHAUS, E.A. & BELL, R. The effect of certain microorganisms and antibiotics on stored-grains insects. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 46(4): 582-97, 1953.
- THRONE, J.E. A fungal parasite (Ascomycetes: Laboulbeniales) of *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 25(2): 115-6, 1989.

- TREMATERRA, P. & GIRGENTI, P. Influence of pheromone and food attractants on trapping of *Sitophilus oryzae* (L.)(Col., Curculionidae): a new trap. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, 108: 12-20, 1989.
- VAIL, P.V.; HOFFMANN, D.F.; TEBBETS, J.S. Autodissemination of *Plodia interpunctella* (Hübner)(Lepidoptera: Pyralidae) granulosis virus by healthy adults. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 29(1): 71-4, 1993.
- VAIL, P.V.; TEBBETS, J.S.; COWAN, D.C.; JENNER, K.E. Efficacy and persistence of a granulosis virus against infestations of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) on raisins. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, 27(2): 103-7, 1991.
- VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. **An introduction to biological control**. New York, Plenum Press, 1982. 247 p.
- WAIB, C.M. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* para coleópteros de produtos e subprodutos armazenados. Campinas, 1992. 98 p. (Mestrado-Universidade Estadual de Campinas)

WALDER, J.M.M. Alguns efeitos da radiação gama em *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1792)(Coleoptera, Bruchidae). Piracicaba, 1974. 69 p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

WILLIAMS, R.N. & FLOYD, E.H. Effect of two parasites, *Anisopteromalus calandrae* and *Choetospila elegans*, upon populations of the maize weevil under laboratory and natural conditions. *Journal of Economic Entomology*, Baltimore, 64: 1407-8, 1971.

WYROSTKIEWICZ, K. & BLAZEJEWSKA, A. The effect of the fungus *Aspergillus fumigatus* Fresenius on the development of the grain weevil *Sitophilus granarius* L.(Col. Curculionidae). *Polskie Pismo Entomologiczne*, Warszawa, 48(2): 245-51, 1978.

ZDÁRKOVÁ, E. & HORÁK, E. Preventive biological control of stored food mites in empty stores using *Cheyletus eruditus* (Schrank). *Crop Protection*, Guilford, 9(5): 378-82, 1990.