INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, UMIDADE RELATIVA DO AR
E DOSE NA EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana*
(Bals.) Vuill. SOBRE *Ceratomyxa arcuata*
Oliv. (COL.: CHRYSOMELIDAE).

Paulo Marçal Fernandes

Orientador: Dr. Sérgio Batista Alves

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro 1986

Aos meus pais, Joaquim e Leopoldina,
e à minha esposa Marta

OFEREÇO E DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao CONVÊNIO EMBRAPA/CNPAP - BOYCE THOMPSON INSTITUTE, na pessoa de seu coordenador, Dr. Donald W. Roberts, pelo financiamento durante o curso de Pós-graduação.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão por me colocar a disposição suas instalações e equipamentos.

Ao Dr. Sérgio Batista Alves, pela orientação, estímulo e amizade.

Aos pesquisadores do CNPAF, Dr. Jeffrey C. Lord e Dr. Bonifácio P. Magalhães, pela colaboração, apoio e amizade.

Ao Dr. Yvo de Carvalho e demais professores do Departamento Fitossanitário da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração e incentivo.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação em Entomologia da ESALQ, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos funcionários dos laboratórios de Entomologia e Patologia de Insetos do CNPAF, Sebastião Martins, Heloisa, Liliane, Expedito, Sebastião Araújo e Edimar pela colaboração e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca do CNPAF pela colaboração e a
poio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelos estímulos e cola
boração.

Ao Dr. Francisco J. P. Zimmermann pelo apoio estatístico.

Aos meus familiares pelo incentivo e apoio.

A Ricardo A. P. de Queiroz pelos serviços datilográficos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Criação de <i>Ceratomyxa arcuata</i> Oliv.	3
2.2. Fatores que afetam a eficiência de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> (Bals.) Vuill.	5
2.2.1. Temperatura	5
2.2.2. Umidade relativa	8
2.2.3. Dose	10
2.2.4. Combinação de fatores	11
2.2.5. Microclima	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Técnica de criação de <i>Ceratomyxa arcuata</i> Oliv...	15
3.2. Eficiência de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.)Vuill. sobre <i>Ceratomyxa arcuata</i> Oliv. sob diferentes temperaturas, umidades relativas e doses	17
3.2.1. Patogenicidade	17
3.2.1.1. Produção, preparação, aplicação e determinação do potencial de inó culo do fungo	17

3.2.1.2. Instalação e condução do teste.	21
3.2.1.3. Controle de temperatura e umida de relativa	23
3.2.1.4. Registro de temperatura e umida de relativa	24
3.2.2. Produção de conídios sobre o inseto ..	26
3.2.3. Produção de conídios em meio de cultu ra	26
3.2.4. Sobrevivência do fungo no interior do inseto	27
3.2.5. Análise estatística	28
3.3. Registro de temperatura e umidade relativa em diferentes ambientes	29
3.4. Condições favoráveis a <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. e aspectos epizoóticos	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Técnica de criação de <i>Cerotoma arcuata</i> Oliv.	32
4.2. Eficiência de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. sobre <i>Cerotoma arcuata</i> Oliv. sob diferentes tempe raturas, umidades relativas e doses	35
4.2.1. Patogenicidade	35
4.2.1.1. Determinação do potencial de inóculo	35
4.2.1.2. Tempos letais	36
4.2.1.3. Interação dos fatores	40
4.2.1.4. Conidiogênese sobre cadáveres	42
4.2.2. Produção de conídios sobre o inseto	45

4.2.3. Produção de conídios em meio de cultu <u>ra</u>	46
4.2.4. Sobrevivência do fungo no interior do inse <u>to</u>	49
4.3. Registro de temperatura e umidade relativa. em diferentes ambientes	53
4.4. Condições de temperatura e umidade relativa favoráveis a <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. e aspectos epizooticos	55
5. CONCLUSÕES	59
6. LITERATURA CITADA	61

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1. Sobrevivência de <i>Cerotoma arcuata</i> produzidos, até a 3 ^a geração, em dieta com folhas, sementes germinadas e plântulas de caupi	32
2. Potencial de inóculo obtido após tratamento de insetos com as suspensões de conídios de <i>Beauveria bassiana</i>	35
3. Efeito da combinação de dose, temperatura e umidade relativa sobre a mortalidade de <i>Cerotoma arcuata</i> por <i>Beauveria bassiana</i>	37
4. Análise da variância do efeito isolado e interativo da temperatura (17,5±1; 24±1 e 30±1°C), umidade relativa (59±5; 72±4; 89±3 e 99±1%) e concentração (0; 1; 10 e 100 conídios/ml x 10 ⁷) sobre a mortalidade de <i>Cerotoma arcuata</i> por <i>Beauveria bassiana</i>	41
5. Conidiogênese de <i>Beauveria bassiana</i> sobre cadáveres de <i>Cerotoma arcuata</i> sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios	43

6. Produção de conídios de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Ceratomyia arcuata* mortos e mantidos sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios 45
7. Número e viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* produzidos em meio BDA + y em diferentes temperaturas durante 15 dias 47
8. Germinação de conídios de *Beauveria bassiana* em meio de cultura após 20 horas de exposição a diferentes temperaturas 48
9. Sobrevivência de *Beauveria bassiana* no interior de adultos de *Ceratomyia arcuata* mortos sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios, e mantidos nas mesmas condições durante 60 dias .. 50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1.	Esquema de criação de <i>Ceratomyia arcuata</i> sobre folhas, sementes germinadas e plântulas de caupi	18
2.	Equipamento de pulverização utilizado em bio ensaios com entomopatôgenos no Laboratório de Patologia de Insetos do CNPAF	20
3.	Equipamento utilizado para exposição de adultos de <i>Ceratomyia arcuata</i> a diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> .	22
4.	Equipamento para registro de temperatura e umidade relativa dentro da câmara.	25
5.	Esquema de registro de temperatura e umidade relativa no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo, utilizando-se um termohigrógrafo eletrônico	31

6. Sobrevivência de *Beauveria bassiana* no interior de adultos de *Ceratomyia arcuata* sob diferentes combinações de temperatura e umidade relativa 52
7. Variação de temperatura e umidade relativa dentro do abrigo da estação meteorológica do CNPAF e no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo durante 24 horas. 54
8. Variação da temperatura e umidade relativa no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo em dias secos e chuvosos 57

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, UMIDADE RELATIVA DO AR
E DOSE NA EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana*
(Bals.) Vuill. SOBRE *Ceratomyxa arcuata*
Oliv. (COL.: CHRYSOMELIDAE).

PAULO MARÇAL FERNANDES

Orientador: Prof. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

Foram feitos estudos visando determinar a influência da combinação de temperatura ($17,5 \pm 1$; 24 ± 1 e $30 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa (U.R.) (59 ± 5 ; 72 ± 4 ; 89 ± 3 e $99 \pm 1\%$) e concentração (0 ; 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/ml) na eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Ceratomyxa arcuata* Oliv. Foram utilizados insetos adultos obtidos de uma colônia de laboratório cuja técnica de criação é descrita. Os efeitos dos fatores testados na mortalidade de *C. arcuata* foram medidos através dos tempos letais que diminuíram em função de aumentos da temperatura e concentração, sendo pouco afetados pela umidade relativa. A conidiogênese foi limitada por alta temperatura e baixa umidade relativa, não ocorrendo a 30°C e a 72 e 59% de U.R. A produção de conídios sobre o inseto foi maior a

24°C, não sendo afetada pela concentração de conídios aplicada. Nas condições que não permitiram conidiogênese foi feito teste de sobrevivência do fungo na fase micelial no interior do cadáver. A 17,5°C e 72% de U.R. houve conidiogênese em mais de 70% dos cadáveres após 60 dias.

Avaliou-se a produção de conídios de *B. bassiana* em meio de cultura a 17,5 , 24 e 30°C. A produção de conídios foi cerca de 20 vezes maior a 17,5 ou 24°C do que a 30°C. O pico de produção ocorreu entre o 3º e 6º dia para as três temperaturas.

Registrou-se o comportamento da temperatura e umidade relativa na estação meteorológica e no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo durante dias secos e chuvosos. Houve maior amplitude diária da temperatura e umidade relativa no ambiente da planta. Compararam-se as condições registradas no campo com a faixa teórica de temperatura e umidade relativa favorável a *B. bassiana*, estabelecida de acordo com os testes de laboratório. Aspectos epizooticos foram discutidos.

EFFECTS OF TEMPERATURE, RELATIVE HUMIDITY OF AIR,
AND DOSE ON THE EFFICACY OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. AGAINST *Ceratomyxa arcuata* Oliv. (COL: CHRYSOMELIDAE).

PAULO MARÇAL FERNANDES

ADVISER: SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY.

Studies were conducted to determine the influence of combination of temperature ($17,5 \pm 1$, 24 ± 1 , and $30 \pm 1^\circ\text{C}$), relative humidity (RH) (59 ± 5 ; 72 ± 4 ; 89 ± 3 , and $99 \pm 1\%$), and concentration of inoculum (0 , 10^7 , 10^8 and 10^9 conidia/ml) on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against *Ceratomyxa arcuata* Oliv. The insects used in experiments were obtained from a laboratory colony for which rearing techniques are described. Lethal time, which was the index of *C. arcuata* mortality used to compare the effects of test parameters, decreased as a function of increasing temperature and dose but was weakly affected by RH. Conidiogenesis was limited by high temperature and low RH, and did not occur at 30°C and

72 or 59% RH. Conidia production on the insects was greatest at 24°C and not affected by the number of conidia applied. Under the conditions that did not permit conidiogenesis fungus survival within the cadavers was tested. At 17,5°C and 72% RH the fungus in 70% of the cadavers retained the ability to conidiate for 60 days.

Conidial production of *B. bassiana* on culture medium was evaluated at 17,5; 24 and 30°C. Approximately 20 times as many conidia were produced at 17,5 or 24°C than at 30°C. The peak of production occurred between the third and sixth day for all three temperatures.

The patterns of temperature and relative humidity at a weather station and in the microclimate affected by cowpea plants in a nearby field were compared under rainy and dry conditions. The daily variation of temperature and RH was greater in the area of plants. Laboratory data were superimposed on the temperature and humidity data registered on the field to construct hypothetical intervals favorable to *B. bassiana*. Epizootiological aspects are discussed.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas espécies de crisomelídeos-pragas que ocorrem no Brasil, as "vaquinhas" *Diabrotica speciosa* (Germ.) e *Cerotoma arcuata* Oliv. estão entre as mais importantes. Embora sejam insetos polí-fagos, seus danos mais sérios ocorrem nas leguminosas como feijão - *Phaseolus vulgaris* (L.) e caupi - *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Segundo SARTORATO *et alii* (1983) os adultos destas espécies provocam desfoliações consideráveis no feijão, e, em alta incidência, podem alimentar-se de flores e vagens, enquanto as larvas se alimentam de raízes e nódulos. Entretanto o principal dano é pela transmissão de agentes fitopatogênicos como as viroses. Ambas espécies transmitem o vírus do mosaico em desenho do feijão (VIEIRA, 1983; SPERANDIO e COSTA, 1982), enquanto *Cerotoma* sp. é citado como eficiente vetor do mosaico severo, uma das principais viroses do caupi (SINGH e ALLEN, 1979; SANTOS, 1982; RIOS *et alii*, 1982).

A utilização de agentes microbianos é uma das alternativas de controle atualmente pesquisadas. O fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill ocorre naturalmente parasitando estas espécies (PANIZZI *et alii*, 1977; DAOUST *et alii*, 1982), e apresenta bom potencial de controle. FERNANDES *et alii* (1984) selecionaram um isolado de *B. bassiana* que se mostrou muito eficiente contra *C. arcuata* e *D. speciosa*. Além disso, existem muitas divergências entre os diversos autores, quanto à importância relativa da temperatura, umidade relativa, dose e do efeito do microclima, na eficácia de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Desenvolveu-se o presente trabalho com os seguintes objetivos:

- estabelecer uma técnica de criação de *C. arcuata* em laboratório visando um suprimento contínuo de indivíduos uniformes e saudáveis;
- estudar a influência da temperatura, umidade relativa do ar e dose na patogenicidade, produção de conídios e sobrevivência de *B. bassiana* sobre *C. arcuata*.
- estudar a influência da temperatura na produção e viabilidade de conídios de *B. bassiana* em meio de cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criação de *Cerotoma arcuata* Oliv.

A maioria das espécies de crisomelídeos dos gêneros *Diabrotica* e *Cerotoma* são criadas de modo similar em dieta natural. RIMANDO *et alii* (1966) descreveram metodologia de criação de *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*. A oviposição foi obtida alimentando-se adultos em plantas de *Vicia faba*. A fase larval desenvolveu-se em plântulas de milho recém germinadas, em caixas plásticas com vermiculita. A cada semana as larvas eram transferidas para outra caixa nas mesmas condições. O desenvolvimento completo variou de 27 a 35 dias e a sobrevivência de ovo a adulto foi de 33,1%. HERZOG *et alii* (1974), descreveram metodologia de criação de *Cerotoma trifurcata*. Os adultos foram alimentados com folhas novas do campo ou com plântulas de soja de 4 a 8 cm de altura, de casa de vegetação. Um dia antes da eclosão das larvas foram adicionados cotiléd^o

nes extraídos de sementes recém germinadas de ervilha, caupi ou feijão que serviram de alimento durante a fase larval. Na fase de pré-pupa as larvas foram transferidas para frascos com uma camada de 1 cm de areia grossa úmida, para pupação. O autor testou três alimentos para o desenvolvimento larval (cotilédones de caupi, soja e feijão) e obteve maior porcentagem de sobrevivência e menor período de desenvolvimento para larva e pupa, quando foi utilizado caupi. A sobrevivência de ovo a adulto em caupi foi de 77%. HOLCOMB e FULTON (1978) desenvolveram metodologia de criação de *Cerotoma trifurcata* combinando os diversos métodos já existentes. Os autores utilizaram folhas de soja, feijão ou caupi para alimentar os adultos e cotilédones de caupi para alimentar as larvas logo após a eclosão. As larvas eram então retiradas dos cotilédones e transferidas para caixas plásticas com camada de 3 cm de diversos substratos, semeadas três dias antes com caupi. O melhor substrato foi a mistura de areia, solo, vermiculita e esterco fino (3:3:1:1). Os autores obtiveram sobrevivência de larva a adulto de 30% e citam utilização de condições tão assépticas quanto possível, temperatura e recipientes adequados como fatores importantes para a eficiência na criação desta espécie.

GONZALES *et alii* (1982) estudaram a morfologia, biologia e hábitos de *Diabrotica balteata* e *Cerotoma fascialis* em laboratório (27°C e 80% de umidade relativa) e em casa de vegetação. Os autores observaram que larvas de *D. balteata* não sobreviveram quando alimentadas em raízes de feijão, e *C. fas*

cialis não aceitou plântulas de milho. A sobrevivência das larvas após 12 dias de infestação foi de 74% para *D. balteata* em milho e 60% para *C. fascialis* em feijão. CARVALHO e HOHMANN (1982) estudaram alguns aspectos biológicos de *Diabrotica speciosa* em condições de laboratório não controladas. Os adultos foram criados em feijoeiro cultivar carioca e as larvas, em raízes de plântulas de milho. O ciclo biológico médio foi de 23,3 dias.

Alguns trabalhos mostram a utilização de dietas artificiais na criação de crisomelídeos. SUTTER *et alii* (1971) manteve *Diabrotica undecimpunctata howard* em uma dieta semi-sintética durante cinco gerações sem mudanças aparentes na morfologia, produção de ovos ou viabilidade. MARRONE *et alii* (1985) criaram esta mesma espécie em dieta artificial modificada de SUTTER *et alii* (1971) e em plântulas de milho. A utilização de plântulas de milho reduziu o custo e o nível de contaminação, principais problemas do uso da dieta artificial.

2.2. Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

2.2.1. Temperatura.

A temperatura afeta os fungos entomopatogênicos durante a germinação e desenvolvimento da infecção (fase parasítica) e após a morte do hospedeiro, na conidiogênese ou espo

rulação (fase reprodutiva), bem como na sobrevivência das estruturas de reprodução. Segundo ROBERTS e YENDOL (1971) os limites de temperatura para o crescimento de fungos estão entre 5 e 35°C e a faixa ótima entre 20 e 30°C. BARSON (1977), citando Schaerffenberg (1957), afirmou que os limites de temperatura para germinação de *B. bassiana* variam de 0 a 40°C. WALSTAD *et alii* (1970) determinaram que a germinação dos conídios desse fungo ocorreu entre 15 e 35°C, com o máximo entre 25 e 30°C.

Entretanto a temperatura ótima para o desenvolvimento do fungo ("in vitro") não é necessariamente a mesma para o desenvolvimento da doença (FERRON, 1978). Este mesmo autor considera que o rápido crescimento micelial e, portanto, a rápida evolução da infecção, depende da temperatura, e que, em geral, valores ótimos estão entre 20 e 30°C, sendo que, para *B. bassiana*, a temperatura ótima é 25°C.

A temperatura influencia ambos, patógeno e hospedeiro, durante o desenvolvimento da doença. FARGUES (1972), estudando as condições de infecção de larvas de *Leptinotarsa decemlineata* por *B. bassiana*, concluiu que as melhores condições para infecção ocorrem a 20°C, devido ao alongamento do ínstar da praga, embora a temperatura ótima para ambos, inseto e fungo, seja 25°C. Observou ainda que a infecção pareceu ser mais influenciada pela temperatura do que pela umidade relativa.

Segundo ROBERTS e CAMPBELL (1977), tanto o desenvolvimento quanto o nível de doença, são mais altos na temperatura ótima para o fungo que em temperaturas mais baixas.

Em alguns casos, temperaturas abaixo do ótimo, aumentam os tempos letais sem afetar a mortalidade total. Temperaturas acima do ótimo podem reduzir ou até mesmo eliminar a mortalidade dos insetos por fungos. BARSON (1977), estudando o efeito da temperatura sobre *B. bassiana* parasitando *Scolytus scolytus*, determinou que a menor mortalidade ocorreu a 5°C (TL_{50} = 45 dias) e a maior a 25°C (TL_{50} = 6 dias). LECUONA (1986) estudou a eficiência dos fungos *B. bassiana* e *B. brongniartii* e do vírus de granulose (GVDs) associados ou não, sobre larvas de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* em quatro temperaturas: 22, 26, 30 e 34°C. O autor não encontrou diferença na mortalidade por *B. bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30°C, porém, a 34°C, o fungo não foi eficiente. A temperatura ótima teórica para *B. bassiana* foi 24,74°C.

A temperatura é muito importante na longevidade de conídios de fungos entomopatogênicos. Segundo ROBERTS e CAMPBELL (1977) a viabilidade de conídios é perdida mais rapidamente em altas que em baixas temperaturas. A influência da temperatura na longevidade dos conídios de *Metarhizium anisopliae* foi mostrada por DAOUST e ROBERTS (1983). Segundo estes autores, quando a temperatura variou de 4 a 37°C, independente das umidades relativas testadas, a longevidade dos conídios aumentou. Resultados semelhantes haviam sido obtidos por CLERK e MADLIN (1965) para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Poecilomyces farinosus*. DAOUST e PEREIRA (1986), estudando a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* sobre cadáveres adultos de *Chalcodermus* sp expostos a 4 e 27°C sob condições de laboratório, ob

servaram um declínio mais rápido da viabilidade dos conídios a 27°C que a 4°C. Após 12 semanas as porcentagens de conídios viáveis estavam entre 97,6 e 99,3% a 4°C e entre 65 e 83% a 27°C.

2.2.2. Umidade relativa.

A umidade relativa é importante na germinação, crescimento micelial, conidiogênese, dispersão e na sobrevivência de fungos entomopatógenos. Entretanto várias pesquisas têm demonstrado que este fator nem sempre é limitante para a eficácia destes microrganismos no controle de pragas. Segundo ROBERTS e YENDOL (1971) a umidade relativa pode ser limitante em dois períodos de uma epizootia por fungos. Inicialmente altas umidades (90% ou mais) são necessárias durante, no mínimo, 48 horas para a maioria dos fungos germinarem e provocarem doença, e depois, a esporulação em cadáveres somente ocorre em altas umidades.

Embora altas umidades relativas sejam consideradas essenciais para o sucesso dos fungos no controle de insetos, vários autores conseguiram infectar e matar insetos independente dos níveis de umidade relativa testados. MADELIN (1966) relatou que *B. bassiana* foi igualmente infectivo a *Lygus hesperus* em umidades relativas de 45, 50 e 70%. MOORE (1973) testou a patogenicidade de tres fungos: *B. bassiana*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani* sobre adultos de *Dendroctonus frontalis* a temperaturas de 0 a 30°C e umidades relativas de 55, 75 e

94%. O autor não encontrou diferenças significativas na mortalidade em função das variações na umidade relativa. FERRON (1977), estudando influência da umidade relativa (0, 35, 55, 76, 92, 98 e 100%) sobre o desenvolvimento de infecção por *B. bassiana* em adultos de *Acanthoscelides obtectus*, mostrou que a infecção ocorre independente da umidade relativa. RAMOSKA (1984) observou que conídios de *B. bassiana* penetraram e foram patogênicos a *Blissus leucopterus* em todos os níveis de umidade relativa testados (0, 30, 50, 75 e 100%).

Vários trabalhos têm mostrado que, embora ocorra infecção por *B. bassiana* em níveis baixos de umidade relativa (menor que 90%), o desenvolvimento da infecção e mortalidade foram acelerados em umidades relativas maiores que 90% (ROBINSON, 1966; FERRON, 1977; DOBERSKI, 1981; RIBA e MARCANDIER, 1984).

O desenvolvimento micelial externo e a conidogênese de *B. bassiana* após a morte do inseto somente tem ocorrido em níveis de umidade relativa próximos ao ponto de saturação (SCHAERFFENBERG 1964; FERRON, 1977; RIBA e MARCANDIER, 1984; ALVES, 1986).

A umidade relativa afeta tanto o patógeno quanto o hospedeiro. FERRON (1981) cita Primak (1968), que observou distúrbios fisiológicos caracterizados por alterações dos hemócitos em lagartas de *Carpocapsa pomonella* mantidas a 40% de umidade relativa, modificando a suscetibilidade à infecção.

A influência da umidade relativa na longevidade de *B. bassiana* foi estudada por RIBA e MARCANDIER (1984). Estes

autores expuseram conídios de *B. bassiana* a diversos níveis de umidade relativa (0, 30, 70, 90 e 100%) a 25°C. Após 25 dias, a 30% de umidade relativa menos de 20% dos conídios foram capazes de germinar. Os conídios apresentaram maior longevidade (acima de 90%) nas umidades relativas de 90 e 100%.

2.2.3. Dose.

Segundo FERRON (1978) a estimativa da DL_{50} varia com a raça do fungo, espécie de inseto visado e modo de aplicação. Este mesmo autor ressalta que tem sido estabelecida por vários autores uma correlação positiva entre o número de esporos infectivos e a mortalidade por fungo, mas a influência de sub-doses tem sido pouco estudada. Para ROBERTS e YENDOL (1971) os valores de DL_{50} em laboratórios tendem a ser um tanto altos, desde que geralmente incluem esporos que não entraram em contato com o inseto.

Vários autores obtiveram acréscimos nos níveis de mortalidade e redução dos tempos letais em função de acréscimos na dose de *B. bassiana* aplicada. FARGUES (1972), estudando as condições de infecção de larvas de *Leptinotarsa decemlineata* por *B. bassiana* confirmou que a mortalidade larval é uma função da dose empregada. Além disso, após inoculação, o processo de infecção pode ser retardado ou acelerado com a dose usada, e que o retardamento na mortalidade é mais significativo quando o inóculo é reduzido. BARSON (1977) submeteu larvas de

Scolytus scolytus a uma série logarítmica de diluições de conídios de *B. bassiana* de $4,8 \times 10^7$ a $4,8 \times 10^4$ conídios/ml. Houve decréscimo no nível de mortalidade em função de decréscimo nas concentrações do inóculo. A DL_{50} após cinco dias foi $1,0 \times 10^6$ conídios/ml. FERNANDES *et alia* (1985) estudaram o efeito de diversas concentrações (2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 e 2×10^8 conídios/ml) e três métodos de inoculação (grão, inseto e folha) na mortalidade da broca do café - *Hypothenemus hampei*, por *B. bassiana*. Houve aumento na mortalidade com o aumento nas concentrações nos três métodos de inoculação.

ALVES (1986) enfatizou a importância de um potencial de inóculo adequado, isto é, uma quantidade adequada de propágulos viáveis do patógeno na superfície do órgão suscetível do hospedeiro, visando ao controle microbiano de insetos.

2.2.4. Combinação de fatores.

Embora vários trabalhos tratem do efeito da temperatura, umidade relativa, dose e outros fatores sobre a eficiência de *B. bassiana*, poucos estudam o efeito simultâneo de dois ou mais destes fatores. FARGUES (1972) estudou o efeito simultâneo de umidades relativas (55, 75 e 100%) e a concentração de conídios (8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 e 8×10^7 conídios/ml) na mortalidade de larvas de *Leptinotarsa decemlineata* por *B. bassiana* e confirmou que a mortalidade larval foi uma fun

ção da concentração aplicada, sendo pouco afetada pela umidade relativa.

MOORE (1973) relatou o efeito da temperatura (5 a 30°C) e umidade relativa (55, 75 e 94%) na patogenicidade dos fungos *B. bassiana*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani* sobre adultos de *Dendroctonus frontalis*. A mortalidade foi influenciada apenas pela temperatura.

DOBERSKI (1981) testou o efeito de três temperaturas (15, 20 e 25°C) em combinação com cinco concentrações de conídios (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 conídios/ml) na mortalidade de *Scolytus scolytus* por *B. bassiana*. Os tempos letais (TL₅₀ e TL₉₀) foram reduzidos em função de aumentos nas concentrações para os três níveis de temperatura. De um modo geral os TL₉₀ não diferiram entre as temperaturas. A percentagem de infecção foi menor a 25°C e nas concentrações mais baixas (10^4 e 10^3 conídios/ml).

ROBERTS e YENDOL (1971) sugeriram que a infecção pode ocorrer em baixas umidades, se altas doses são usadas. RAMOSKA (1984) testou a influência da umidade relativa (0, 30, 50, 75 e 100%) e dose ($2,1 \times 10^7$, $2,1 \times 10^6$, $2,1 \times 10^5$ conídios/inseto) na mortalidade de *Blissus leucopterus* por *B. bassiana*. Após 12 dias houve 100% de mortalidade na dose mais alta para todas umidades relativas e 100% de mortalidade a 0 e 30% de umidade relativa para todas as doses. O autor afirmou que o estresse em níveis baixos de umidade relativa aumentaria a suscetibilidade dos insetos à doença e portanto, um menor número de conídios seria suficiente para matá-los.

provável explicação para esta divergência.

A importância do microclima tem sido ressaltada por vários autores. ROBERTS e YENDOL (1971) enfatizam que o microclima ao redor do fungo é o ambiente crítico, e citam Hall e Dunn (1958) que observaram epizootias de fungos sobre afídeos, em campos de alfafa irrigada situados em áreas desérticas.

A umidade relativa atmosférica e a micro umidade relativa na superfície do inseto seriam diferentes. Existiria uma fina camada de ar úmido na superfície do inseto de modo análogo a situação encontrada na superfície de folhas de plantas (FERRON, 1977; RAMOSKA, 1984; RIBA e MARCANDIER, 1984). WAGGONER (1965), em estudos do microclima envolvendo superfície de plantas, mostrou que uma camada de ar úmido está presente imediatamente próximo a superfície da folha.

Segundo RAMOSKA (1984) a micro umidade na superfície do inseto ou na superfície do inseto se alimentando de uma folha, seria suficiente para que os conídios germinassem e penetrassem no corpo do inseto. A não produção de conídios em baixas umidades relativas seria devido a morte do inseto, quando este passaria à mesma umidade atmosférica, sendo o fungo então dessecado e morto.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Goiânia (Goiás - Brasil), entre setembro de 1985 e abril de 1986.

3.1. Técnica de criação de *Ceratomyxa arcuata* Oliv.

A técnica de criação de *C. arcuata* foi estabelecida em 1983 e vem sendo aperfeiçoada desde esta época. Baseia-se na utilização de dieta com folhas, sementes germinadas e plântulas de caupi.

Cerca de 70 adultos não sexados foram confinados em frasco de vidro (4 litros) com fundo forrado com um disco de papel filtro. Como alimento foram utilizadas folhas de caupi previamente lavadas, sendo o excesso de água das mesmas eliminado antes da sua colocação nos frascos. A boca dos

frascos foi vedada de modo a permitir trocas gasosas (tampa telada).

A postura foi obtida nas folhas e no papel filtro, sendo retirada a cada dois dias por ocasião da troca do alimento. As folhas e papel com ovos foram imersos em água com espalhante adesivo Agral durante 1 a 2 horas. Os ovos foram separados do substrato por agitação manual e através de um pincel. Após a separação do substrato os ovos normais, fezes e pequenos fragmentos de folha precipitam-se. A massa precipitada foi colocada em um "coador" de tecido tipo "crepe". Com auxílio de um pincel e uma piseta com água destilada foi feita uma lavagem da massa dissolvendo e eliminando as fezes. Ficaram retidos os ovos e fragmentos de folha. Utilizando-se uma pinça, eliminaram-se os fragmentos de folha.

A incubação dos ovos foi feita em placas de Petri (15 x 90 mm) com fundo coberto por um disco de papel de filtro. Utilizando-se um pincel espalham-se de 100 a 200 ovos por placa. O papel filtro foi umedecido, sem saturar, e nesta condição foi mantido durante todo período de incubação. No 5º dia foram adicionadas 30 sementes germinadas, em condições assépticas, por placa. Antes da germinação as sementes são lavadas, esterilizadas externamente com solução de hipoclorito de sódio (0,05%) durante 10 minutos e enxaguadas.

As larvas eclodindo no 6º e 7º dias, alimentamse das sementes germinadas durante quatro dias quando foram transferidas (10º dia), juntamente com as sementes, para bandejas (35 x 30 x 6 cm) cheias com solo estéril, nas quais foram

semeadas cerca de 150 sementes um a dois dias antes da transferência. Em cada bandeja foram colocadas larvas de 10 a 15 placas. As larvas completam seu desenvolvimento, empupam e a emergência dos adultos ocorre entre o 25º e 30º dia. Todas as fases foram conduzidas sob condições de laboratório não controladas.

A Figura 1 mostra um esquema de todas as fases desta técnica.

3.2. Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra *Ceratomyxa arcuata* Oliv. sob diferentes temperaturas, umidades relativas e doses.

3.2.1. Patogenicidade.

Testou-se a patogenicidade do isolado CP5 de *B. bassiana* da coleção de entomopatógenos do CNPAF, obtido originalmente de *Ceratomyxa* sp no Estado do Amazonas, sobre adultos de *C. arcuata* (2ª e 3ª geração de laboratório) com 3 a 8 dias de idade sob as seguintes condições em combinação:

- a) temperatura (°C) 17,5±1; 24,0±1; 30,0±1.
- b) umidade relativa (%) 59±5; 72±4; 89±3; 99±1.
- c) concentração (conídios/ml): 0; 10⁷; 10⁸; 10⁹.

3.2.1.1. Produção, preparação, aplicação e determinação do potencial de inóculo.

Figura 1 - Esquema de criação de *Cerotoma arcuata* sobre folhas, sementes germinadas e plântulas de caupi.

O fungo foi produzido em placas de Petri com meio de cultura BDA + y (Batata - 200 g; Dextrose - 12 g; Agar-22 g e extrato de levedura (y) - 4 g, para 1 litro de meio) utilizando-se inóculo já com três repicagens no mesmo meio.

O meio inoculado foi mantido a 26°C durante 15 dias quando foi feita a coleta, coagem e preparação da suspensão do fungo em água estéril mais Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos de ensaio, diluída e quantificada através de contagens em hemocitômetro. Através de diluições obtiveram-se suspensões com as concentrações: 10^7 ; 10^8 e 10^9 conídios/ml que, juntamente com a testemunha (água estéril mais Tween 80 a 0,1% v/v) constituíram os tratamentos aplicados sobre os insetos.

A viabilidade dos conídios foi determinada através de teste de germinação em meio BDA + y a 25°C durante 20 horas, sendo que esta foi de 100%.

Os insetos foram separados previamente em grupos com nove indivíduos. Cada grupo era anestesiado com gás carbônico e pulverizado com 0,5 ml de suspensão. O equipamento de pulverização utilizado pode ser observado na Figura 2. Este equipamento foi desenvolvido por pesquisadores do CNPAF e consta basicamente de uma câmara de acrílico acoplada a um compressor, a um medidor de fluxo de ar e a um aspirador.

Para a determinação da dose do fungo em conídios por inseto seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima. Os grupos pulverizados foram colocados em gaiolas de arame e dei

Figura 2 - Equipamento de pulverização utilizado em bioensaios com entomopatógenos no Laboratório de Patologia de insetos. 1. Seringa; 2. Bico de pulverização; 3. Regulagem da altura de pulverização; 4. Medidor de fluxo de ar (manômetro); 5. Tubo de conexão ao compressor de ar; 6. Tubo de conexão ao aspirador; 7. Suporte (peneira) para material a ser pulverizado e 8. Orifício para introdução de pipeta contendo o patógeno em suspensão.

xados durante duas horas para secagem das suspensões. Depois foram novamente anestesiados, colocados em um tubo de ensaio com 1 ml de água destilada mais Tween 80 (0,1% v/v) e deixados em repouso por um dia. Em seguida foi feita agitação intensa dos tubos visando retirada completa dos conídios da superfície dos insetos. Quantificou-se em hemocitômetro e o número de conídios obtido foi dividido por nove (número de insetos) determinando-se a dose em conídios por inseto, isto é, o potencial de inóculo, uma vez que a viabilidade foi de 100%.

Para cada concentração pulverizada foi feita a contagem em cinco grupos de nove insetos e para cada suspensão obtida de um grupo foram feitas contagens em duas lâminas perfazendo um total de dez repetições.

3.2.1.2. Instalação e condução do teste.

Após pulverização, cada grupo de insetos era colocado em gaiolas de arame teladas com secção transversal triangular (visando encaixe no suporte). Estas gaiolas foram confeccionadas manualmente a partir de pedaços de tela de arame de 12 x 10 cm. As gaiolas foram vedadas dobrando-se suas extremidades e agrupadas em uma bandeja correspondente a cada concentração aplicada. Utilizou-se um suporte com quatro faces, confeccionado com lâminas de isopor, onde se colocou uma gaiola de cada bandeja (concentração) tomadas ao acaso e fixadas por uma liga de borracha. Cada conjunto era colocado na câmar de controle de umidade e o conjunto completo (Figura 3) era

Figura 3 - Equipamento utilizado para exposição de adulto de *Ceratomyxa arcuata*, a diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios de *Beauveria bassiana*.

então colocado na respectiva incubadora.

Cada tratamento era constituído da combinação de uma temperatura, uma umidade relativa e uma concentração perfazendo um total de 48 tratamentos. Para cada tratamento foram pulverizados 36 insetos em quatro repetições de nove indivíduos. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com arranjo dos tratamentos em fatorial $3 \times 4 \times 4$.

Foram feitas leituras diárias de mortalidade e os insetos mortos até o 2º dia foram eliminados. Os cadáveres a partir do 3º dia foram mantidos nas gaiolas. O alimento (pequenas fatias de tubérculo da cucurbitácea taiuiã - *Ceratosanthus hilariana* Cogn.) era trocado diariamente. Utilizou-se este tubérculo atrativo devido a grande aceitação pelos insetos e pela maior resistência a perda de água em baixas umidades relativas do que as folhas. O teste foi encerrado no 10º dia e uma semana após foi feita a leitura de confirmação de infecção através do número de insetos com sinais externos do fungo (conidogênese).

3.2.1.3. Controle de temperatura e umidade relativa.

Foram utilizadas tres estufas incubadoras para BOD previamente reguladas para os níveis de temperatura desejados e com escotofase de 24 horas.

Como câmaras de controle de umidade relativa foram utilizados frascos de vidro com capacidade para quatro litros (Figura 3) nos quais foram colocados 200 ml de água desti

lada ($99 \pm 1\%$ de umidade relativa) ou 200 ml de água destilada saturada (demais níveis de umidade relativa) com os seguintes sais:

- a) Sulfato de potássio - K_2SO_4 - P.A. 25 g/200 ml de água destilada para $89 \pm 3\%$ de umidade relativa.
- b) Cloreto de sódio - NaCl - P.A. 55 g/200 ml de água destilada para $72 \pm 4\%$ de umidade relativa.
- c) Nitrato de magnésio - $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ P.A. 350 g/200 ml de água destilada para $59 \pm 5\%$ de umidade relativa.

As soluções saturadas foram preparadas adicionando-se o sal e agitando-se intensamente até não ocorrer dissolução do precipitado. A solução era então colocada nos frascos adicionada de mais alguns gramas do sal. Os frascos foram mantidos hermeticamente fechados e sob as temperaturas desejadas. Foram feitos testes visando determinar variações na umidade relativa em função de variação na temperatura e/ou presença de alimento e insetos dentro das câmaras. Estas variações estiveram dentro dos limites obtidos por outros autores como WEXLER e HASEGAWA (1954) e PETERSON (1953).

3.2 1.4. Registro de temperatura e umidade relativa.

O registro de temperatura e umidade relativa durante o teste, foi feito utilizando-se um termohigrógrafo eletrônico (DATAPOD MODEL DP-220), cujo sensor era acoplado à tampa no interior do frasco (Figura 4). O aparelho foi programado para leituras a cada 30 minutos durante 20 dias. Os dados arma

Figura 4 Equipamento para registro de temperatura e umidade relativa dentro da camara.

zenados no aparelho foram transferidos para um computador para impressão. Através das médias aritméticas e amplitudes obtidas foram estabelecidos os níveis de temperatura e umidade relativa durante o teste.

3.2.2. Produção de conídios sobre o inseto

A determinação do número de conídios produzidos por indivíduo foi feita utilizando os insetos mortos no teste de patogenicidade, nos tratamentos em que ocorreu conidiogênese, aos sete dias após morte dos últimos indivíduos.

Os insetos de cada repetição foram colocados em tubo de ensaio com 10 ml de água destilada mais o espalhante Tween 80 (0,1% v/v). Após intensa agitação foram feitas diluições e contagens em hemocitômetro. A concentração em conídios/ml, multiplicada pelo volume (10 ml) e dividida pelo número de insetos utilizados forneceu o número médio de conídios por inseto.

3.2.3. Produção de conídios em meio de cultura.

Determinou-se a quantidade de conídios produzidos por cm^2 de meio de cultura BDA + y nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo do teste de patogenicidade.

Como inóculo foi utilizada uma suspensão diluída preparada com conídios de 3.^a repicagem em BDA + y. Colocouse 0,1 ml da suspensão sobre o meio de cultura e espalhou-se u

niformente com auxílio de uma alça de bastão de vidro. Para cada temperatura foram utilizadas dez placas de Petri com meio, selecionando-se cinco placas com desenvolvimento mais uniforme do fungo para as contagens.

As contagens foram feitas aos 3, 6, 9 e 15 dias após a inoculação, retirando-se um disco (11 mm de diâmetro) de meio de cultura com fungo, suspendendo-se em 10 ml de água destilada mais o espalhante Tween 80 (0,1% v/v). Agitou-se intensamente, diluiu-se e quantificou-se em hemocitômetro. Para cada uma das cinco repetições (placas) foi retirada uma amostra (disco de meio) em cada dia de contagem. A contagem foi feita em duas lâminas para cada amostra, perfazendo 10 contagens para cada temperatura.

Determinou-se a viabilidade dos conídios através da germinação em meio BDA + y aos 3, 9 e 15 dias. Utilizou-se a mesma suspensão preparada para a quantificação, espalhou-se sobre o meio de cultura e manteve-se as placas à 25°C durante 20 horas, quando foi determinada a percentagem de conídios germinados.

De modo semelhante ao descrito anteriormente, foi feito um teste de germinação de conídios nas três temperaturas, utilizando-se seis placas (repetições) para cada temperatura.

3.2.4. Sobrevivência do fungo no interior do inseto.

A determinação do tempo de sobrevivência do fun

go dentro dos insetos foi feita utilizando-se insetos do teste de patogenicidade, mortos em condições que não permitiram a conidiogênese, sendo que os insetos permaneceram nas mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo em que morreram.

Os insetos mortos em cada repetição de um mesmo tratamento foram reunidos e mantidos numa mesma câmara eliminando-se aqueles colonizados por bactérias (corpo escuro, flácido e exalando odor desagradável).

Foram feitas amostragens aos 0, 10, 30 e 60 dias após encerramento do teste de patogenicidade. Para cada dia de amostragem foi tomada uma amostra de oito insetos para cada tratamento.

Cada amostra foi colocada numa câmara úmida(placa de Petri com papel filtro umedecido) e mantida a 25°C durante cinco dias quando era feita a contagem do número de insetos com sinais externos do fungo.

3.2.5. Análises estatísticas.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se programas S.A.S. através do Centro de Computação da EMBRAPA. Os tempos letais (TL_{50} e TL_{90}) foram determinados através da análise de probites. Na análise dos resultados de alguns experimentos foi feita a análise da variância e o teste de Tukey foi utilizado na comparação de médias.

3.3. Registro de temperatura e umidade relativa em diferentes ambientes

Utilizando-se dois termohigrógrafos eletrônicos (Mod. DATAPOD DP 220) programados para leituras a cada 30 minutos durante 17 dias foram obtidos dados de temperatura e umidade relativa em dois ambientes:

- dentro do abrigo na estação meteorológica do CNPAF;
- no microclima proporcionado por uma planta de caupi com 45 dias de idade, protegido por uma cobertura de papelão revestida com plástico (Figura 5), sob condições de campo (aproximadamente a 1 km da estação).

Os dados armazenados foram transferidos para um computador para impressão. Os resultados foram apresentados através de gráficos elaborados com as médias a cada 30 minutos durante 12 dias sem chuvas e durante cinco dias em que ocorreram chuvas intensas não contínuas.

3.4. Condições favoráveis a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e aspectos epizooticos.

De acordo com os dados de laboratório obtidos no presente trabalho foi estabelecida uma faixa teórica de temperatura e umidade relativa, favorável a *B. bassiana*. Considerou-se como faixa favorável a combinação de temperatura e umidade relativa que proporcionou menores tempos letais, níveis mais altos de conidiogênese, maior produção de conídios sobre

o inseto e maior tempo de sobrevivência do fungo dentro do inseto.

Esta faixa foi comparada com os dados de comportamento da temperatura e umidade relativa no microclima de uma planta de caupi sob condições de campo, no CNPAF, em dias secos e chuvosos.

Figura 5 - Esquema de registro de temperatura e umidade relativa no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo, utilizando-se um termohigrógrafo eletrônico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Técnica de criação de *Cerotoma arcuata* Oliv.

Os dados de sobrevivência de ovo a adulto de *C. arcuata* até a 3.^a geração são mostrados na Tabela 1. A sobrevivência de ovo a adulto aumentou de 22,7% na 1.^a geração para

Tabela 1 - Sobrevivência de *Cerotoma arcuata* produzidos até a 3.^a geração, em dieta com folhas, sementes germinadas e plântulas de caupi *Vigna unguiculata*. EMBRAPA/CNPAP, 1986.

Geração Obtida	Número inicial aproximado de ovos.	Número de adultos obtidos	Sobrevivên cia (%)
1. ^a	3.900	885	22,7
2. ^a	6.200	1.751	28,2
3. ^a	13.400	4.185	31,2

ção para 31,2% na 3.^a geração. Isto pode ser explicado pela adaptação da espécie às condições de laboratório. HOLCOMB e FULTON (1978), utilizando técnica semelhante para *Cerotoma trifurcata*, obtiveram 30% de sobrevivência de larva a adulto. RIMANDO *et alii* (1966) criaram *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata* em dieta com plântulas de milho e obtiveram sobrevivência de ovo a adulto de 33,1%. Portanto, a técnica utilizada no presente trabalho mostrou eficiência bem próxima à daquelas empregadas por outros autores. Esta técnica foi menos trabalhosa que as técnicas similares descritas por HERZOG *et alii* (1974) e HOLCOMB e FULTON (1978) para *C. trifurcata*. Por estas técnicas as larvas desenvolvem-se inicialmente em cotilédones de sementes de caupi germinadas das quais foram retirados o embrião e a casca. Este procedimento é muito trabalhoso e aumenta o nível de contaminação. Na criação de *C. arcuata* as sementes germinadas são mantidas intactas, permanecem vivas e continuam se desenvolvendo. Assim, a contaminação diminui e cria-se um ambiente propício às larvas. Além disso, por esta técnica, as larvas são transferidas para o solo junto com as plântulas diminuindo o estresse devido ao manejo.

Apesar de não terem sido obtidos dados da biologia de *C. arcuata* nas condições em que foi desenvolvida esta técnica, algumas observações puderam ser feitas, tais como:

- 1 - A postura foi abundante com viabilidade alta dos ovos (acima de 70%).
- 2 - O período de incubação durou de 6 a 7 dias.
- 3 - Períodos larval, pre-pupal e pupal duraram de 19 a 23 di

as, sendo o ciclo total de 25 a 30 dias. 4 - Sexagem dos adultos pode ser feita através das antenas (macho apresenta tubérculo) e da área entre os olhos compostos (clara nos machos e escura nas fêmeas).

A seguir são feitas sugestões de trabalhos de pesquisa a serem efetuados visando maior eficiência na criação de *C. arcuata*:

- estudo da biologia completa de *Ceratomyia arcuata* determinando os seguintes parâmetros: duração, viabilidade e temperatura base para ovo, larva, pupa e adulto, período de pré e pós-oviposição e oviposição das fêmeas, número de instares larvais, número de ovos por fêmea, razão sexual, tabela de vida etc;

- testar a infestação direta das bandejas com ovos pouco antes da eclosão das larvas, misturados a sementes germinadas;

- determinar condições ótimas para armazenamento de ovos, que facilitarão muito os trabalhos na criação e o planejamento da produção de insetos;

- testar outras dietas com diferentes variedades de caupi ou feijão, e outras espécies como soja, milho etc;

- testar dietas artificiais de espécies afins já existentes e/ou desenvolver dietas a base de grãos para *C. arcuata*.

4.2. Eficiência de *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuill. sobre *Cerotoma arcuata* Oliv. sob diferentes temperaturas, umidades relativas e doses.

4.2.1. Patogenicidade.

4.2.1.1. Determinação do potencial de inóculo.

Os resultados relativos a determinação do potencial de inóculo em número de conídios por inseto, correspondentes as concentrações em conídios/ml, pulverizadas sobre os insetos no teste de patogenicidade, estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Potencial de inóculo obtido após tratamento de insetos com as suspensões de conídios de *Beauveria bassiana*. EMBRAPA/CNPAP, 1986.

Concentração pulverizada (Conídios/ml x 10 ⁷)	Potencial de inóculo (Número médio de conídios ^T viáveis por inseto x 10 ³)
1	8,3
10	35,0
100	333,0

Houve relação proporcional entre as doses e concentrações mais altas. Uma redução de dez vezes na concentração (10⁹ para 10⁸) implicou redução de cerca de dez vezes na dose (333,0 x 10³ para 35,0 x 10³). O mesmo não ocorreu em

relação a concentração e dose mais baixa. Assim, enquanto a concentração foi reduzida de dez vezes (10^8 para 10^7) a dose foi reduzida em cerca de quatro vezes ($35,0 \times 10^3$ para $8,3 \times 10^3$). Esta desproporção pode ser devida a menor precisão na quantificação, em hemocitômetro, da suspensão obtida pela lavagem dos insetos pulverizados com a concentração mais baixa, pois o número de conídios por campo de contagem esteve muito abaixo da faixa ótima de precisão do aparelho.

4.2.1.2. Tempos letais.

A Tabela 3 mostra o efeito da combinação dos fatores testados sobre tempos letais de *C. arcuata* inoculados com *B. bassiana*.

O fungo *B. bassiana* provocou mortalidade de *C. arcuata* em todas combinações dos fatores testados. De um modo geral, os tempos letais foram mais afetados pela concentração e temperatura, diminuindo em função de aumentos nos níveis destes fatores. O efeito da concentração foi mais evidente a $17,5^\circ\text{C}$ e 89% de umidade relativa. As TL_{50} foram de 11,2; 9,2; 7,5 e 6,6 dias para as concentrações de 0, 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/ml respectivamente. Nas três temperaturas e a 59% de umidade relativa os TL_{50} e TL_{90} para a concentração 10^7 não diferiram da testemunha (concentração 0). Na temperatura de $17,5^\circ\text{C}$ houve aumento dos tempos letais em relação a 24°C , porém não afetou a mortalidade total, confirmando afirmações de

Tabela 3 - Efeito da combinação de dose, temperatura e umidade relativa sobre a mortalidade de *Ceratomyxa arcuata*** por *Beauveria bassiana*. EMBRAPA/CNPAP, 1986.

Temperatura. (°C)	Umidade relativa (%)	Concentração do fungo (Conídios/ml x 10 ⁷)*							
		0		1		10		100	
		Tempos letais (Dias).							
		TL ₅₀	TL ₉₀	TL ₅₀	TL ₉₀	TL ₅₀	TL ₉₀	TL ₅₀	TL ₉₀
17,5±1	99±1	11,2	13,9	9,2	11,1	7,5	9,5	6,6	8,1
	89±1	13,9	19,1	9,4	12,4	7,4	9,3	6,7	8,1
	72±4	13,7	19,7	10,0	13,9*	8,5	10,4	7,3	9,0
	59±5	10,1	15,5	8,9*	12,0*	7,3	9,8	7,3	9,0
24±1	99±1	7,2	11,8	5,3	7,1	4,9	5,9	4,1	5,4
	89±3	6,4	10,3	5,4	7,8	4,5	5,9	3,9	4,9
	72±4	8,6	13,4	6,0	10,0*	5,1	6,6	4,3	5,4
	59±5	6,5	10,4	6,5*	10,2*	5,0	6,4	4,7	5,7
30±1	99±1	5,1	7,4	4,7*	6,6*	4,4*	6,1*	4,3*	5,7
	89±3	5,6	9,9	5,9*	8,3*	5,1*	7,3*	3,9	5,5
	72±4	5,7	9,4	4,6	6,7	4,3	5,9	4,2	5,4
	59±5	5,3	8,6	4,6*	7,9*	4,3	6,5	3,7	5,3

(*) Tempo letal (em linha) cujo intervalo de confiança apresenta intersecção com o intervalo de confiança da dose 0 (Testemunha) (limite de confiança para 95%).

(**) Foram testados de 28 a 36 adultos por tratamento.

(***) Concentrações correspondem, respectivamente, às seguintes doses em conídios por inseto x 10³: 0; 8,3; 35 e 333.

ROBERTS e CAMPBELL (1977). Segundo estes autores, temperaturas abaixo do ótimo podem aumentar os tempos letais sem afetar a mortalidade. Os dados da Tabela 3 mostram que altas concentrações amenizam os efeitos da baixa temperatura, reduzindo bastante os tempos letais. Assim, a 17,5°C e concentração 10^9 os TL_{90} ficaram entre 8,1 e 9,0 dias, enquanto que a 24°C (próximo do ótimo) e concentração 10^7 , os TL_{90} variaram de 7,1 a 10,2 dias.

Com relação a temperatura de 24°C os efeitos da concentração não foram tão nítidos quanto a 17,5°C. Os insetos morreram mais rápido nas duas concentrações mais altas. Nas combinações de temperatura e umidade relativa ótimas para *B. bassiana* (24°C e 89% ou 99%) os TL_{50} não diferiram entre as concentrações, mostrando que, nestas condições, uma menor quantidade de conídios é necessária para matar os insetos. Estes dados contradizem as afirmações de RAMOSKA (1984). Este autor lançou a hipótese de que o estresse em níveis baixos de umidade relativa aumentaria a suscetibilidade dos insetos à doença, e portanto, um menor número de conídios seria necessário para matá-los.

A 30°C houve efeito nítido da concentração apenas nos níveis de umidade relativa mais baixos (72 e 59%). Nesta temperatura em combinação com altas umidades relativas (99 e 89%) os tempos letais praticamente não diferiram entre as concentrações exceto para 89% e concentração 10^9 . Entretanto ficou claro que *B. bassiana* foi capaz de infectar e matar os insetos nesta temperatura. De um modo geral pode-se a

firmar que os tempos letais a 24 e 30°C não foram diferentes entre si.

Os tempos letais não diferiram entre os níveis de umidade relativa testados, especialmente nas concentrações mais altas (10^8 e 10^9). Na concentração mais alta e temperatura de 17,5°C, os TL_{50} variaram de 6,6 a 7,3 dias, entre os quatro níveis de umidade relativa, enquanto que, para mesma concentração e a 24°C e 30°C, esta variação foi de 3,9 a 4,7 e 3,9 a 4,3 dias, respectivamente.

Estes resultados mostram que, nas condições deste teste, a umidade relativa não influenciou na infecção e morte dos insetos por *B. bassiana*, concordando com os dados de diversos autores (MADELIN, 1966; MOORE, 1973; FERRON, 1977 e RAMOSKA, 1984). O desenvolvimento da infecção e morte dos insetos não foi acelerado por umidades relativas mais altas, discordando dos dados de outros autores (ROBINSON, 1966; FERRON, 1977; DOBERSKI, 1981; RIBA e MARCANDIER, 1984). O que pode ser explicado pela diferença em relação aos métodos, especialmente no controle da umidade relativa, raça do fungo e espécie do inseto utilizados pelos vários autores.

O efeito da temperatura e umidade relativa na sobrevivência dos adultos *C. arcuata* pode ser observado comparando-se os tempos letais da testemunha. Os tempos letais foram muito afetados pela temperatura e diminuíram em função do aumento desta. Nas temperaturas extremas (30 e 17,5°C), os insetos sobreviveram por mais tempo em umidades intermediárias (89 e 72%). A combinação menos favorável foi 30°C e 99%

de umidade relativa que provocou 90% de mortalidade em 7,4 dias. A 24°C a umidade relativa não afetou a sobrevivência dos insetos.

Estes dados mostram as dificuldades de condução de estudos desta natureza, pois nas combinações de condições menos favoráveis ao inseto, ocorrem altos níveis de mortalidade na testemunha mascarando os resultados.

4.2.1.3. Interação dos fatores.

A análise da variância do efeito isolado e interativo dos fatores estudados neste trabalho, sobre a mortalidade de *Ceratomyia arcuata* por *B. bassiana* é apresentada na Tabela 4. As explicações dos efeitos isolados e interativos são baseados nos dados da Tabela 3.

Houve efeito isolado e interativo da temperatura e concentração, significativo a 0,1%, para todos os dias. Isto pode ser explicado pelo aumento da mortalidade de *C. arcuata* em função do aumento da temperatura para todas as concentrações e vice versa. Altas concentrações (10^9) compensaram baixas temperaturas (17,5°C) e altas temperaturas (30°C) compensaram baixas concentrações (10^7), mostrando o efeito interativo.

A umidade relativa apresentou efeito significativo apenas no 8º, 9º e 10º dia, mostrando que este fator é mais importante sob temperaturas ou concentrações baixas, pois nas temperaturas e doses mais altas praticamente todos inse

Tabela 4 - Análise da variância do efeito isolado e interativo da temperatura (17,5+1; 24+1 e 30+1°C), umidade relativa (59+5; 72+4; 89+3 e 99+1%) e concentração (0; 1; 10 e 100 confídios/ml x 10⁷) sobre a mortalidade de *Ceratomyxa arcuata* por *Beauveria bassiana*. EMBRAPA/CNPAF, 1986.

FONTE DE VARIACÃO	Graus de liberdade	Quadrados médios								
		DIAS APOS APLICAÇÃO DO FUNGO								
		5	6	7	8	9	10			
Umidade relativa (U.R.)	3	0,0074NS	0,0063NS	0,0457NS	0,0760**	0,0559*	0,0465*			
Temperatura (T)	2	5,1792***	7,9230***	7,8586***	5,5630***	2,4645***	1,1116***			
Concentração (C)	3	0,8745***	1,2039***	1,2126***	1,1011***	1,3706***	1,4481***			
U.R. x C	9	0,0466NS	0,0128NS	0,0168NS	0,0202NS	0,0156NS	0,0326*			
U.R. x T	6	0,0540NS	0,0432NS	0,0304NS	0,0313NS	0,0294NS	0,0191NS			
C x T	6	0,1885***	0,1950***	0,1219***	0,2560***	0,3589***	0,3438***			
C x U.R. x T	18	0,0212NS	0,0190NS	0,0375NS	0,0444**	0,0180NS	0,0143NS			
Erro	144	0,0314	0,0250	0,0202	0,0176	0,1723	0,0141			
C.V.		46,6239	29,3847	21,5058	17,4091	16,0089	13,8634			

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(**) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

(***) Significativo ao nível de 0,1% de probabilidade pelo teste F.

(NS) Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

tos morreram antes do oitavo dia. Esta explicação pode ser utilizada para a interação tripla, significativa a 1%, ocorrida no 8º dia. Não houve interação significativa da umidade relautiva com os demais fatores, exceto no 10º dia, quando praticaamente só restavam insetos da testemunha.

Portanto, pode-se afirmar que, em condições adequadas de temperatura e concentração, a umidade relativa não influencia na mortalidade de *C. arcuata* por *B. bassiana*.

4.2.1.4. Conidiogênese sobre cadáveres.

Os níveis de conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de *C. arcuata* sob diferentes combinações de faatores são apresentados na Tabela 5.

A conidiogênese foi limitada por alta temperaatura e umidades relativas baixas. Praticamente não ocorreu coonidiogênese na temperatura de 30°C para todos níveis de umiudade relativa e nas umidades mais baixas (72 e 59%) para as três temperaturas. Nas combinações de altas umidades relatiivas (99 a 89%) e temperaturas mais baixas (24 e 17,5°C) a porocentagem de cadáveres com conidiogênese variou 53,0 a 83,3% entre as concentrações. Houve tendência de uma maior porcentaagem de cadáveres com conidiogênese na temperatura mais baixa (17,5°C) ou na concentração mais alta (10^9).

Em relação a influência da umidade relativa no desenvolvimento micelial e conidiogênese de *B. bassiana* sobre o cadáver, estes resultados confirmam os dados obtidos por dii

Tabela 5 - Conidiogênese de *Beauveria bassiana* sobre cadáveres de *Ceratomyia arcuata** sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios. EMBRAPA/CNPAP, 1986.

Umidade relativa (%)	Concentração do fungo (co nídios/ml x 10 ⁷)	Porcentagem de insetos com sinais externos do fungo(conidiogênese).		
		Temperatura (°C)		
		17,5±1	24±1	30±1
99±1	0	0	0	0
	1	72,2	53,0	0
	10	72,2	61,0	7
	100	77,1	74,9	0
89±3	0	0	0	0
	1	77,8	58,3	0
	10	71,4	57,1	0
	100	83,3	80,5	0
72±4	0	0	0	0
	1	0	0	0
	10	0	0	0
	100	0	0	0
59±3	0	0	0	0
	1	0	0	0
	10	0	0	0
	100	0	0	0

(*) 28 a 36 insetos adultos avaliados por tratamento.

versos autores (SCHAERFFENBERG, 1964; FERRON, 1977; RIBA e MARCANDIER, 1984). Estes autores mostraram que a conidiogênese sobre o cadáver ocorreu apenas nos níveis de umidade relativa próximos ao ponto de saturação.

A influência da temperatura na conidiogênese de *B. bassiana* "in vitro" foi estudada por WALSTAD *et al.* (1970). Este autor afirmou que a conidiogênese ocorreu mesmo em temperaturas menores que 10°C e maiores que 35°C, sendo mais rápida a 25 e 30°C. Os resultados do presente trabalho mostraram que a conidiogênese sobre o cadáver do inseto não ocorreu a 30°C, discordando das informações do autor citado. Esta divergência pode ser explicada pela grande quantidade de microrganismos, interna e externamente, presentes no cadáver do inseto e ausentes no meio de cultura ("in vitro"). Estes microrganismos, especialmente bactérias e fungos contaminantes, como *Aspergillus*, favorecidos pelas temperaturas mais altas, colonizam o hospedeiro mais rapidamente que *B. bassiana*. Desta forma o fungo entomopatogênico pode infectar e matar o inseto, mas seu desenvolvimento micelial e a conidiogênese são inibidos pela ação mais rápida dos contaminantes.

O comportamento de umidade relativa na infecção, morte e conidiogênese de *B. bassiana* tem sido explicado da mesma maneira pelos vários autores que obtiveram resultados semelhantes a este. O desenvolvimento da infecção e morte dos insetos independente da umidade relativa é devido a existência, na superfície do inseto, de uma camada de ar com umidade alta, pouco influenciada pela umidade relativa atmosférica. Esta umidade é suficiente para que o conídio germine e penetre no inseto. Entretanto, a conidiogênese não ocorre em umi

dades relativas baixas devido a morte do inseto, quando a umidade relativa no interior do inseto se aproxima da umidade relativa atmosférica. Portanto, pode-se concluir que o fungo *B. bassiana* necessita de alta umidade relativa desde a germinação até a conidiogênese, mas a umidade relativa microclimática na superfície dos insetos vivos é diferente da umidade relativa atmosférica.

4.2.2. Produção de conídios sobre o inseto.

O número médio de conídios de *B. bassiana* produzidos sobre o cadáver de *C. arcuata* em diferentes combinações de fatores são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Produção de conídios de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Ceratomyia arcuata* mortos e mantidos sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios. EMBRAPA/CNPAP. 1986.

Temperatura. (°C)	Umidade relativa (%)	Número médio de conídios/inseto x 10 ⁷ Concentração (Conídios/ml x 10 ⁷)			Média
		1	10	100	
17,5±1	99±1	4,9	5,7	4,2	4,9a*
	89±3	4,5	3,8	3,4	3,9a
24±1					4,4A
	99±1	6,4	7,1	6,8	6,8a
	89±3	6,0	4,6	6,8	5,8a
					6,3B
	Média	5,4a	5,3a	5,3a	-

(*) Médias seguidas pela mesma letra na linha ou na coluna não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

O número médio de conídios produzidos por inseto variou de $3,4 \times 10^7$ a $7,1 \times 10^7$. A umidade relativa e concentração do fungo nos níveis testados, não influenciaram significativamente na produção de conídios. A temperatura afetou a produção de conídios. A média geral de conídios produzidos por inseto a 24°C foi de $6,3 \times 10^7$, diferindo significativamente dos $4,4 \times 10^7$ conídios por inseto produzidos a $17,5^\circ\text{C}$. Estudo semelhante foi feito por RAMOSKA (1984). Este autor encontrou diferenças na produção de conídios sobre cadáver do percevejo das gramíneas *Blissus leucopterus*, em função da umidade relativa. O número médio de conídios por inseto foi de $1,2 \times 10^5$ a 75% e $4,4 \times 10^6$ a 100% de umidade relativa. A produção de conídios sobre o inseto a 75% de umidade relativa, obtida por este autor, é contraditória com os resultados obtidos no presente trabalho, e nos trabalhos de outros autores (SCHAERFFENBERG, 1964; FERRON, 1977; RIBA e MARCANDIER, 1984), nos quais a conidiogênese somente ocorreu em umidades relativas próximas a 100%. Provavelmente esta divergência é devida às diferenças relativas aos sistemas de controle de umidade relativa, espécie de inseto e raça do fungo utilizados nos vários trabalhos.

4.2.3. Produção de conídios em meio de cultura.

A Tabela 7 mostra o efeito da temperatura no número e viabilidade dos conídios produzidos por cm^2 de superfície de meio de cultura.

Tabela 7 - Número e viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* produzidos em meio BDA + y em diferentes temperaturas durante 15 dias. EMBRAPA/CNPAF, 1986

Temperatura (°C)	Tempo apos inoculação do fungo (dias)					
	3	6	9	15		
	Conídios por $\text{cm}^2 \times 10^6$	Viabilidade de** (%)	Conídios por $\text{cm}^2 \times 10^6$	Viabilidade de (%)	Conídios por $\text{cm}^2 \times 10^6$	Viabilidade de (%)
17,5+1	12,0c*	98	670,0a	-	741,0a	99
24 +1	102,0b	99	532,0a	-	702,0a	99
30 +1	7,5c	96	46,0b	-	37,0b	49
Média	40,5A	-	416,0B	-	493,3B	451,0B

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

(**) Porcentagem de conídios germinados após 20 horas a 25°C.

A temperatura influenciou tanto a produção quanto a viabilidade dos conídios. Até o 3º dia a produção foi significativamente maior a 24°C que nas demais temperaturas. A partir do 6º dia as produções de conídios a 17,5 e 24°C não foram diferentes entre si, porém, ambas foram significativamente maiores que a 30°C. O número de conídios produzidos após nove dias a 24 e 17,5°C foi cerca de 20 vezes maior que a 30°C. Não houve acréscimo do número de conídios produzidos a partir do 6º dia. Isto mostra que, nas temperaturas e quantidade de inóculo utilizados no presente trabalho, a produção máxima de conídios em meio de cultura ocorre entre o 3º e 6º dia, independente da temperatura. A viabilidade dos conídios somente foi afetada pela temperatura após o 9º dia. No 15º dia a viabilidade foi de 49% a 30°C, enquanto que nas demais temperaturas esta continuou próxima de 100%.

A temperatura não afetou a germinação dos conídios (Tabela 8) em meio de cultura, mesmo a 30°C. Portanto, a

Tabela 8 - Germinação de conídios de *Beauveria bassiana* em meio de cultura após 20 horas de exposição a diferentes temperaturas. EMBRAPA/CNPAP, 1986.

Temperatura (°C)	Porcentagem média de conídios germinados.
17,5+1	99
24 +1	100
30 +1	99

baixa produção de conídios nesta temperatura pode ser explicada pelo pouco desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do fungo. Este aspecto pode ser observado visualmente, pois a 30°C o fungo apresentava camada pouco espessa que não cobria perfeitamente a superfície do meio.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para a conidiogênese sobre o inseto (Tabela 5) e mostram os efeitos negativos de temperaturas altas como 30°C no desenvolvimento micelial de *B. bassiana*. Assim pode-se afirmar com segurança que este isolado de *B. bassiana* não tolera temperaturas altas, embora sua origem seja de uma região caracterizada por altas temperaturas e umidades relativas.

4.2.4. Sobrevivência do fungo no interior do inseto.

A sobrevivência do fungo *B. bassiana* na fase micelial no interior do cadáver, em diferentes condições e durante 60 dias, é mostrada na Tabela 9 e Figura 6.

A temperatura e umidade relativa influenciaram na sobrevivência do fungo, mas a concentração aplicada não foi importante. A 30°C nenhum inseto apresentou conidiogênese após 60 dias. Entretanto a porcentagem média de conidiogênese nesta temperatura não ultrapassou 12,5% na 1ª amostragem, mostrando que mesmo em umidades relativas baixas os contaminantes se desenvolveram e inibiram *B. bassiana*.

Tabela 9 - Sobrevivência de *Beauveria bassiana* dentro de adultos de *Ceratomyia arcuata* mortos sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios, e mantidos nas mesmas condições durante 60 dias. EMBRAPA/CNPAP, 1986.

Temperatura. (°C)	Umidade relativa (%)	Concentração do fungo (conídios/ ml x 10 ⁷	Sobrevivência (% conidiogênese) Dias de amostragem*			
			0	10	30	60
17,5+1	72+4	1	-	87,5	87,5	83,3
		10	100	87,5	75,0	63,6
		100	87,5	100	62,5	71,4
		Média	93,7	91,7	75,0	72,8
	59+5	1	-	75,0	62,5	27,3
		10	62,5	87,5	62,5	30,0
		100	87,5	87,5	75,0	44,4
		Média	75,0	83,3	66,7	33,9
	72+4	1	75	62,5	62,5	63,6
		10	87,5	100	100	70,0
		100	100	87,5	100	66,7
		Média	87,5	83,3	87,5	66,8
24+1	59+5	1	50,0	62,5	62,5	9,1
		10	87,5	87,5	50,0	28,6
		100	100	100	62,5	30,0
		Média	79,2	83,3	58,3	22,6
	72+4	1	12,5	0	0	0
		10	0	0	12,5	0
		100	25	0	25	0
		Média	12,5	0	12,5	0
	59+5	1	0	12,5	0	0
		10	12,5	0	12,5	0
		100	25	0	25	0
		Média	12,5	4,2	12,5	0

(*) 8 insetos por dia de amostragem tomados ao acaso.

Nas demais temperaturas e na umidade relativa mais baixa houve um decréscimo acentuado na sobrevivência do fungo da 1.^a para a última amostragem (Figura 6). A porcentagem média de conidiogênese caiu de 75 para 33,9% a 17,5°C e de 79,2 para 22,6% a 24°C. Enquanto na umidade relativa mais alta a porcentagem média de conidiogênese após 60 dias foi de 72,8% a 17,5°C e 66,8% a 24°C. A morte mais rápida do fungo a 59% de umidade relativa pode ser devida ao dessecamento. A umidade interior do inseto morto é muito influenciada pela umidade relativa atmosférica, e em consequência, o micélio é dessecado e perde viabilidade mais rapidamente nas menores umidades relativas.

Estes dados mostram que *B. bassiana* pode sobreviver, na fase micelial, dentro de cadáveres de insetos, em condições de temperatura e umidade relativa desfavoráveis à conidiogênese, por mais de 60 dias. Esta pode ser uma forma importante de sobrevivência de fungos sob condições de campo. Assim o fungo se mantém dentro do inseto até que ocorram condições favoráveis à conidiogênese. Além disso, é possível que em condições desfavoráveis, ocorram estruturas especiais de resistência que aumentam o tempo de sobrevivência, não só de *B. bassiana*, como de outros fungos. Esta é uma área em que pesquisas e estudos mais aprofundados precisam ser desenvolvidos.

Embora não tenham sido encontrados trabalhos semelhantes a este na literatura, pode-se citar os resultados obtidos por DAoust e PEREIRA (1986). Estes autores demonstra

Figura 6 - Sobrevivência de *Beauveria bassiana* no interior de adultos de *Ceratomyia arcuata* sob diferentes combinações de temperatura e umidade relativa. Os insetos foram mantidos sob as mesmas condições antes e a pós a morte.

ram que conídios de *B. bassiana* podem sobreviver por várias semanas sobre cadáveres de *Ceratomya* sp.

O fungo pode sobreviver por algum tempo dentro do inseto na forma de micélio até que ocorram condições favoráveis a conidiogênese. Os conídios sobre o cadáver sobrevivem por mais algum tempo até que sejam levados pelas chuvas e ventos ao solo.

4.3. Registro de temperatura e umidade relativa em diferentes ambientes.

A Figura 7 mostra a variação dos dados referentes a temperatura e umidade relativa em diferentes ambientes.

Com relação à temperatura pode-se observar que no microclima da planta sob condições de campo, a amplitude térmica diária foi maior que na estação meteorológica. Assim, a temperatura máxima diária esteve acima de 30°C no microclima proporcionado pela planta, enquanto que, na estação esteve próximo a 27°C. Durante a noite a temperatura do microclima esteve sempre alguns graus abaixo da observada na estação.

A umidade relativa também apresentou amplitude diária maior neste microclima. Durante as horas mais frias esteve sempre acima (> 90%) da umidade relativa na estação. Neste microclima a umidade relativa mínima chegou a ser menor que 55%, enquanto que na estação meteorológica esta foi maior que 62%.

Figura 7 - Variação da temperatura (A) e umidade relativa (B) dentro do abrigo da estação meteorológica do CNPAF (—) e no microclima proporcionado por uma planta ce caupi sob condições de campo (---) durante 24 horas. Cada ponto é a média dos dados de 12 dias sem chuvas tomados a cada meia hora, no mês de fevereiro de 1986.

Estes resultados mostram diferenças no comportamento da temperatura e umidade relativa na estação meteorológica e no microclima proporcionado por uma planta num campo de caupi. Se ocorrem estas diferenças da temperatura e umidade relativa devido ao microclima de um campo de caupi de 45 dias, cujas plantas não cobriam sequer 10% da área, e situada cerca de 1 km apenas da estação meteorológica, qual seria então a validade dos dados de uma estação meteorológica, para o ambiente de uma cultura fechada e situada a vários quilômetros de distância, em relação aos insetos e microrganismos presentes?

É importante que trabalhos semelhantes a este sejam desenvolvidos para as diferentes fases de desenvolvimento das culturas de caupi e feijão e em diferentes locais e épocas do ano. Os dados obtidos devem ser submetidos a análises de correlação e regressão visando estabelecer coeficientes de correção dos dados climáticos das estações meteorológicas para estudos em condições microclimáticas.

4.4. Condições de temperatura e umidade relativa favoráveis a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e aspectos epizooticos

Foi estabelecida como a faixa teórica favorável para o desenvolvimento de epizootias *B. bassiana* a combinação de temperatura entre 17,5 e 28°C com umidades relativas acima de 86%. No presente trabalho as temperaturas de 17,5 e

24°C foram satisfatórias para a conidiogênese e sobrevivência de *B. bassiana*, embora os tempos letais tenham sido maiores a 17,5°C. A temperatura de 30°C limitou totalmente a conidiogênese e sobrevivência do fungo. Considerou-se 17,5°C como limite mínimo e 28°C como limite máximo favorável a *B. bassiana*. Como este fungo se comportou bem tanto a 99±1% como a 89±3% de umidade relativa considerou-se 86% como o limite mínimo de umidade relativa favorável a *B. bassiana*.

A Figura 9 mostra a variação da temperatura e umidade relativa no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo em dias secos e chuvosos e os períodos de condições favoráveis a *B. bassiana*.

Nos dias sem chuvas a temperatura apresenta amplitude térmica diária grande. A temperatura máxima foi maior que 32°C e a mínima menor que 17°C. O período das 19 às 8:00 horas foi favorável a *B. bassiana*, pois a temperatura esteve entre 17,5 e 28°C e a umidade relativa foi maior que 86%. Ocorreram 13 horas de condições favoráveis e 11 horas desfavoráveis. Provavelmente este período diário de condições desfavoráveis limite a ocorrência de epizootias de *B. bassiana* na região. Entretanto estudos futuros devem ser desenvolvidos para elucidar os efeitos negativos deste período no desenvolvimento de *B. bassiana* e na ocorrência de epizootias.

Nos dias com chuvas o comportamento da temperatura e umidade relativa durante a noite não difere dos dias secos. A amplitude térmica é menor devido a menor variação da temperatura no período diurno. Neste período, tanto a tempera

Figura 8 - Variação da temperatura (---) e umidade relativa (—) no microclima proporcionado por uma planta de caupi sob condições de campo durante 24 horas. Cada ponto é a média de dados de cinco dias com chuvas (A) e 12 dias sem chuvas (B) tomados a cada meia hora, durante o mês de fevereiro de 1986.

tura quanto a umidade relativa, se aproximam mais das condições favoráveis a *B. bassiana*. Nestes dias a faixa favorável ao fungo é ampliada para 16 horas e 30 minutos por dia. A temperatura foi favorável durante 24 horas e a umidade relativa foi menor que 86% durante oito horas e 30 minutos com limite mínimo de 70%. Segundo os dados de laboratório, *B. bassiana* pode sobreviver na fase micelial no interior do inseto nas condições citadas acima. As epizootias não ocorrem na região mesmo nos dias chuvosos, mostrando que outros fatores de campo estão envolvidos. Um destes fatores é a predação de cadáveres recém mortos, por outros insetos, especialmente formigas, que pode limitar a propagação do fungo no campo. Este é um fator que precisa ser estudado.

As chuvas são importantes pois reduzem a temperatura no período diurno, impedindo que esta ultrapasse os níveis favoráveis ao fungo, mas o comportamento da umidade relativa não é muito afetado por estas, e sim pela temperatura. Portanto, a temperatura pode ser considerada como importante fator que limita a ocorrência de epizootias de *B. bassiana* em campos de caupi nesta região. Nestas condições, a melhor estratégia de utilização do fungo no controle de *Ceratomyxa arcuata* seria como inseticida microbiano. É importante que o inseto entre em contato com um potencial de inóculo suficiente, o que pode ser obtido com um método de aplicação eficiente e formulação que aumente a meia vida do fungo no campo, além do perfeito conhecimento da biologia e comportamento do inseto.

5. CONCLUSÕES.

De acordo com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que:

- *Ceratomyxa arcuata* pode ser criado sobre folhas, sementes germinadas e plântulas de caupi.

- Os tempos letais de *Ceratomyxa arcuata* inoculados com *Beauveria bassiana* são muito influenciados pelo efeito isolado e interativo da temperatura e dose do entomopatôgeno.

- Em condições de temperatura e dose adequadas a *B. bassiana*, a umidade relativa não afeta os tempos letais.

- A conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de *C. arcuata* é limitada por altas temperaturas ou baixas umidades relativas.

- A produção de conídios no inseto é maior na temperatura ótima para *B. bassiana*, não sendo influenciada pela dose aplicada.

- A produção de conídios de *B. bassiana* em meio de cultura diminui em temperaturas próximas a 30°C, sendo que o pico de produção a 17,5; 24 e 30°C, ocorre entre o 3º e 6º dia.

- O fungo *B. bassiana* pode sobreviver, na fase micelial, no interior de cadáveres de *Ceratomyxa arcuata* por várias semanas em temperaturas e umidades relativas desfavoráveis a conidiogênese.

- Os dados climáticos de estações meteorológicas não devem ser utilizados em estudos com patógenos e insetos em condições microclimáticas proporcionadas pelas culturas.

6. LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B., 1986. Epizootiologia. In: ALVES, S. B. (ed.). Controle Microbiano de Insetos. Editora Manole LTDA, São Paulo.p.29-60.
- BARSON, G., 1977. Laboratory envaluation of *Beauveria bassiana* as a pathogen of the larval stage of the elm bark beetle, *Scolytus scolytus*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 29:361-366.
- CARVALHO, S. M. e C. L. HOHMANN, 1982. Biologia e consumo foliar de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L., 1753). In: ANAIS DA 1.^a REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. EMBRAPA/CNPAP, Goiânia, GO,10-15 de janeiro de 1982. p. 244-245.
- CLERK, T.C. e M. F. MADELIN, 1965. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. Transactions British Mycological Society, 48(2): 193-209.

DAOUST, R. A.; D. W. ROBERTS e R. S. SOPER, 1982. Surveys for insect pathogens on pest and nonpest species of cowpea in Brazil, with particular emphasis on fungal disease agents. In: 1.^a REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI. EMBRAPA/CNPAF, Goiânia, GO, 17-22 de outubro de 1982, p. 99-100. "Resumos".

DAOUST, R. A. e D. W. ROBERTS 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitos. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 41: 143 - 150.

DAOUST, R. A. e R. M. PEREIRA, 1986. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in the laboratory in Brazil. Environmental Entomology, College Park, 15:642-647.

DOBERSKI, J. W., 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fangosus*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 37:195-200.

FARGUES, J. 1972. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Fungi imperfecti). Entomophaga, Zurich, 17:319-337.

FERNANDES, P. M.; R. A. DAOUST; B. P. MAGALHÃES e M. YOKOYAMA, 1984. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* aplicada sobre folhas de caupi (*Vigna unguiculata*) e tubérculos de *Cayaponia* sp a *Diabrotica speciosa* e *Ceratomyza* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9, Londrina, 1984. p. 174. "Resumos".

FERNANDES, P. M.; R. E. LECUONA e S. B. ALVES, 1985. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à broca-do-café, *Hypotenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae) Ecossistema, Piracicaba, 10:176-181.

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

FERRON, P., 1978. Biological control of insects pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, Palo Alto, 23: 409-442.

FERRON, P., 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarrhizium*. In: BURGESS, H. D. Microbiol control of pests and plant diseases 1970 - 1980. New York, Burgess, Academic Press, p. 465-482.

GONZALES, R; C. CARDONA e A. V. SCHOONHOVEN, 1982. Morfologia y biologia de los crisomelidos *Diabrotica balteata* Le Conte y *Cerotoma fascialis* Erickson como plagas del frijol comum. Turrialba, 32(3):257-264.

HERZOG, D. C., C. E. EASTMAN, e L. D. NEWSOM, 1974. Laboratory rearing of the bean leaf beetle. Journal of Economic Entomology, Menasha, 67(6):794-795.

HOLCOMB, C. E. e J. P. FULTON, 1978. Rearing the bean leaf beetle, *Cerotoma trifurcata*, for plant virus vector studies. Plant Disease Reporter, Beltsville, 62(1):12-14.

LECUONA, R. E., 1986. Controle microbiano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch e virus da granulose, e simulação dos efeitos de sua aplicação. Piracicaba, ESALQ/USP, 170 p. (Dissertação de Mestrado).

MADELIN, M. F., 1966. Fungal parasites of insects. Annual Review of Entomology, Palo Alto, 11:423-448.

MARRONE, G; F. D. FERRI; T. R. MOSLEY e L. J. MEINKE, 1985. Improvements in laboratory rearing of the southern corn root worm, *Diabrotica undecimpunctata howard* Barber (Coleoptera: Chrysomellidae), on an artificial diet and corn. Journal of Economic Entomology, Menasha, 78(1):290-292.

- MOORE, G. E., 1973. Pathogenicity of three entomogenous fungi to the southern pine beetle at various temperatures and humidities. Environmental Entomology, College Park, 2(1): 54-57.
- PANIZZI, M. F.; B. S. CORRÊA; D.L. GAZZONI; E. B. de OLIVEIRA; G. G. NEWMAN e S. G. TURNIPSEED, 1977. Insetos da soja no Brasil. Londrina, Pr, EMBRAPA/CNPSo, 20 p. (Boletim Técnico)
- PETERSON, A., 1953. Humidities by saturated salt solutions. In: Manual of Entomological Techniques, Edwards Bros. Inc., Ann Arbor. Michigan.
- RAMOSKA, W. A., 1984. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity, and replication in the Chinch bug *Blissus leucopterus*, Journal of Invertebrate Pathology, New York, 43:389-394.
- RIBA, G. e S. MARCANDIER, 1984. Influence de l'humidité sur l'agressivité et la viabilité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorokin, hyphomycètes pathogènes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hubn. Agronomie, 4(2):189-194.
- RIMANDO, L. C.; R. A. COREY, e Y. P. SUN, 1966. Mass rearing of the western spotted cucumber beetle. Journal of Economic Entomology, Menasha, 59(1):230-231.

RIOS, G. P.; B. P. das NEVES e J. KLUTHCOVSKI, 1982. A ocorrência do mosaico severo do caupi e da população do vetor *Ceratoma arcuata* em Goiânia. In: 1.^a REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI. EMBRAPA/CNPAP, Goiânia, GO, 17-22 de outubro de 1982. p. 111. "Resumos".

ROBERTS, D. W. e W. G. YENDOL, 1971. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H. D., Microbial control of insects and mite. Ed. Burgess, Academic Press, New York, p. 125-149.

ROBERTS, D. W. e A. S. CAMPBELL, 1977. Stability of entomopathogenic fungi. In: C. M. IGNOFFO e D. L. HOSTETTER (Ed.) , Environmental Stability of Microbial Insecticides, 3, New York, Miscellaneous Publications of the Entomological Society of América, 10. p. 19-76.

ROBINSON, R. K., 1966. Studies on penetration of insect integument by fungi. Pest articles and news summaries, 12(2-3):131-142. Section B.

SANTOS, A. A. dos, 1982. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) no estado do Piauí. In: 1.^a REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI. EMBRAPA/CNPAP, Goiânia, GO, 17-22 de outubro de 1982. p. 99-100. "Resumos".

- SARTORATO, A.; C. A. R. SEIJAS e M. YOKOYAMA, 1983. Principais doenças e pragas do feijoeiro comum no Brasil. EMBRAPA-CNPAF, Documentos, 5.
- SCHAERFFENBERG, B., 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. Journal of Insect Pathology, New York, 6:8-20.
- SINGH, S.R. e D. J. ALLEN, 1979. Parasitos y enfermedades del caupi. IITA, Manual series nº 2. Idaban, Nigéria.
- SPERANDIO, C. A. e C. L. COSTA, 1982. Besouros crisomelídeos vetores do mosaico em desenho do feijoeiro. In: ANAIS DA 1ª REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. EMBRAPA/CNPAF, Goiânia, GO, 10-15 de janeiro de 1982. p. 231-233.
- SUTTER, G. R.; J. L. KRYSAN, e P. L. GUSS, 1971. Rearing the southern corn rootworm on artificial diet. Journal of Economic Entomology, Menasha, 64(1):65-67.
- VIEIRA, C., 1983. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa, U.F.V., Impr. Univ., 231 p.
- WAGGONER, P. E., 1965. Microclimate and plant disease. Annual Review of Phytopathology, 3:103-126.

WALSTAD, J.D; R. F. ANDERSON e W.J.S. TAMBAUCH, 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology, New York, 16:221-226.

WEXLER, A. e S. HASSEGAWA, 1954. Relative humidity - temperature relationships of some saturated salt solutions in the temperature range 0° to 50°C. Research of National Bureau of standards. 53(1):19-26.