

ESTABILIDADE DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN  
(HYPHOMYCETES) NO SOLO E SUA PATOGENICIDADE  
AO *Chalcodermus aeneus* BOHEMAN (COLEOPTERA:  
CURCULIONIDAE), PRAGA DO CAUPI

ELIANE DIAS QUINTELA  
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. 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 - Área de Concentração: Entomologia.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Setembro - 1986

A memória de minha querida irmã  
*Luciana* e aos meus queridos pais,  
*Agnaldo* e *Dail*, pelo amor com  
preensão e constante estímulo.

## AGRADECIMENTOS

Ao *Boyce Thompson Institute* na pessoa do Dr. *Donald Wilson Roberts* pelo apoio financeiro e incentivo durante o trabalho.

À *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)* e ao *Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAPF)* pela oportunidade oferecida.

Ao Dr. *Sérgio Batista Alves*, pela orientação e revisão do trabalho.

Ao Dr. *Jeffrey Crowell Lord* pela orientação, revisão do trabalho e versão do Summary.

A Dra. *Sônia Milagres Teixeira* pela amizade, colaboração, auxílio, sugestões, revisão do texto e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega, *Ricardo Silva Araujo* pela amizade, incentivo e valiosas sugestões durante a realização do trabalho, e pela revisão do texto.

Aos pesquisadores da área de Entomologia do *Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão* em especial ao *Bonifácio Peixoto Magalhães* pela amizade e revisão do trabalho.

Aos colegas, *José Aloísio Alves Moreira* e *Silvando Carlos da Silva* pela amizade, auxílio e assessoramento na parte de solos.

Ao Dr. *Francisco José Pfeilsticker Zimmermann* pelo auxílio na parte de estatística.

Aos docentes do Departamento de Entomologia da *Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)*, da Universidade de São Paulo (USP) pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. *Flávio Moscardi* e Dr. *Richard Alan Daoust* pelo incentivo e valioso treinamento inicial na área de Patologia de Insetos.

À bibliotecária, *Iracema Costa Magalhães* pela amizade e correção das referências bibliográficas.

Aos técnicos de laboratório de Entomologia do CNPAF, em particular a *Heloisa C. Martins*, *Liliane S. Coelho*, *Sebastião M. dos Santos* e *Edmar Cardoso de Moura*, pela amizade e apoio nas atividades de campo e laboratório.

Aos técnicos do laboratório de Fitopatologia do CNPAF, em particular a *Maria de Lourdes Soares* e *Edilamar E. de Souza* pela colaboração nas atividades do laboratório.

A *Waltí da Silva Dezzen* pela gentileza e prestativa colaboração na digitação dos dados.

Ao *Sebastião José de Araújo* pela valiosa col  
aboração na confecção dos gráficos e desenhos.

A *Claudeci A. da Silva* pela prestativa ajuda  
na datilografia do texto.

As amigas, *Geni A. Sabino* e *Lélia W. de Campos*  
pelo carinho e colaboração durante o desenvolvimento do tra  
balho.

As amigas *Antônia do C. Barcelos Correia*, *Arte*  
*misia M. Villas Boas*, *Sônia Komatsu*, *Thora L. Aagesen*, *Maria*  
*Goretti A. de Lima* e aos amigos *Willy Chiaravalle*, *Paulo M.*  
*Fernandes*, *Roberto Lecuona* pelo apoio e estímulo durante o  
desenvolvimento do curso e do trabalho.

A todos os funcionários e colegas da *Escola*  
*Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* e do *Centro Nacio*  
*nal de Pesquisa de Arroz e Feijão* que direta ou indiretamen  
te, contribuíram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO . . . . .	1
2. REVISÃO DE LITERATURA . . . . .	5
2.1. Efeito de fatores bióticos e abióticos na esta- tabilidade de fungos entomopatogênicos . . . . .	6
2.1.1. Efeito da temperatura e umidade . . . . .	6
2.1.2. Efeito da radiação solar . . . . .	9
2.1.3. Efeito de microrganismos . . . . .	10
2.1.4. Efeito do pH . . . . .	12
2.1.5. Efeito da matéria orgânica e adubação. . . . .	12
2.2. Desenvolvimento saprofítico de fungos entomopa- togênicos . . . . .	13
2.3. Persistência de fungos entomopatogênicos no so- lo em condições de campo. . . . .	14
2.4. Patogenicidade de fungos a insetos no so- lo . . . . .	16
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	20
3.1. Efeito da temperatura, conteúdo de água no solo e microrganismos na estabilidade de <i>B. bassiana</i> em condições controladas . . . . .	20
3.1.1. Fungo utilizado. . . . .	20
3.1.2. Produção de conídios . . . . .	21
3.1.3. Solo . . . . .	21
3.1.4. Análise química e física do solo . . . . .	21
3.1.5. Meio seletivo para isolar <i>B. bassiana</i> do solo . . . . .	23
3.1.6. Determinação da percentagem de saturação de água no solo . . . . .	27

3.1.7. Procedimento experimental . . . . .	27
3.1.8. Análise de microrganismos do solo . . . . .	30
3.2. Estabilidade de <i>B. bassiana</i> em condições de cam po . . . . .	32
3.2.1. Procedimento experimental . . . . .	32
3.2.2. Determinação da curva de retenção de <u>á</u> gua no solo . . . . .	35
3.3. Patogenicidade de <i>B. bassiana</i> a larvas e adultos do manhoso, <i>Chalcodermus aeneus</i> Boheman. . . . .	38
3.3.1. Solo . . . . .	38
3.3.2. Criação do inseto . . . . .	38
3.3.3. Fungo utilizado nos bioensaios. . . . .	40
3.3.4. Proecimento experimental . . . . .	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO. . . . .	45
4.1. Efeito da temperatura, conteúdo de água no solo e microrganismos na estabilidade de <i>B. bassiana</i> em condições controladas . . . . .	45
4.2. Estabilidade de <i>B. bassiana</i> em condições de campo. . . . .	66
4.3. Patogenicidade de <i>B. bassiana</i> a larvas e adultos do manhoso, <i>Chalcodermus aeneus</i> Boheman . . . . .	75
5. CONCLUSÕES . . . . .	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	92
7. APÊNDICE. . . . .	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Esquema do pulverizador utilizado para aplicação do fungo. Goiânia, GO. 1986. . . . .	33
2 Croqui da Área Experimental. CNPAF. Goiânia, GO. 1986. . . . .	34
3 Curva característica de retenção de umidade obtida por secagem de amostras de solo, terra roxa estruturada latossólica eutrófica. (Média de 3 repetições). CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	37
4 Torre calibrada de pulverização direta. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	43
5 Número de colônias de <i>B. bassiana</i> a $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água em solo autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	47
6 Número de colônias de <i>B. bassiana</i> a $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água em solo não autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	47
7 Número de colônias de <i>B. bassiana</i> a $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 75% da saturação em solo autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.. . . . .	48



8	Número de colônias de <i>B. bassiana</i> a $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 75% da saturação solo não autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.. . . . .	48
9	Número de colônias de <i>B. bassiana</i> por grama de solo a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água em solo autoclavado (A) e não autoclavado (NA) em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.. . . . .	55
10	Número de colônias de fungos por grama de solo autoclavado (FA) e não autoclavado (FNA) a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	55
11	Número de colônias de bactérias por grama de solo autoclavado (BA) e não autoclavado (BNA) a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	61
12	Número de colônias de bactérias por grama de solo com (Bb) e sem <i>B. bassiana</i> (Bsb) a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.. . . . .	61
13	Número de colônias de actinomicetos por grama de solo autoclavado (AA) e não autoclavado (NA) a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.. . . . .	63
14	Número de colônias de actinomicetos por grama de solo com (Ab) e sem (Asb) <i>B. bassiana</i> a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.. . . . .	63

- 15 Número de colônias de *B. bassiana* por grama de solo, aplicado na superfície em solo com planta, aplicado na superfície em solo desnudo, misturado ao solo desnudo e sem aplicação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . . 67
- 16 Temperatura máxima e mínima em solo desnudo e solo gramado (área tracejada) no período de 25 de fevereiro a 31 de maio. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . . 72
- 17 Radiação solar acumulada em calorias/cm<sup>2</sup> no período de 25 de fevereiro a 31 de maio. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . . 73
- 18 Precipitação pluviométrica em milímetro, no período de 25 de fevereiro a 31 de maio. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . . 74
- 19 Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de 10<sup>7</sup> conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF. Goiânia, GO. 1986. . . . . 80
- 20 Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de 10<sup>8</sup> conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . . 81

21	Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , pulverizados na dosagem de $10^9$ conídios/ml em larvas do último instar de <i>C. aeneus</i> . CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	82
22	Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , pulverizados na dosagem de $10^7$ conídios/ml em larvas do último instar de <i>C. aeneus</i> . CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	85
23	Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , pulverizados na dosagem de $10^8$ conídios/ml em larvas do último instar de <i>C. aeneus</i> . CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	87
24	Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , pulverizados na dosagem de $10^9$ conídios/ml em larvas do último instar de <i>C. aeneus</i> . CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página	
1	Características químicas e físicas do solo estudado, terra roxa estruturada latossólica eutrófica, e características químicas de amostras deste solo autoclavado (a 121°C durante 2 horas) e não autoclavado. CNPAF, Goiânia, GO. 1986 . . . . .	22
2	Número médio de colônias de <i>B. bassiana</i> por placa de Petri em diferentes meios de cultura seletivos (média de 3 repetições). CNPAF. Goiânia, GO. 1986 . . . . .	26
3	Características químicas do solo orgânico distrófico, textura argilosa, esterilizado (estufa a 160°C durante 4 horas) e não esterilizado. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	39
4	Número de colônias $\times 10^4$ de <i>Beauveria bassiana</i> (média de 3 repetições), em diferentes temperaturas e percentagem de saturação de água, por grama de solo seco autoclavado e não autoclavado, vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986. . . . .	49
5	Análise de variância para as avaliações de efeito de temperatura e saturação de água em solo autoclavado e não autoclavado, em condições controladas. CNPAF, Goiânia, GO. 1986 . . . . .	51

6	Análise de variância para as avaliações de efeito de temperatura e saturação de água em solo autoclavado, não autoclavado, em condições controladas, para sete avaliações. CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	54
7	Análise de variância para a presença de fungos, bactérias e actinomicetos no solo autoclavado e não autoclavado, na presença ou não de <i>B. bassiana</i> , em cada avaliação. CNPAF, Goiânia, GO, 1986..	57
8	Análise de variância para a presença de fungos bactérias e actinomicetos no solo autoclavado e não autoclavado, na presença ou não de <i>B. bassiana</i> , CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	60
9	Análise de variância para as análises de campo, com e sem plantas de caupi (cobertura), com e sem aplicação de <i>B. bassiana</i> na superfície e misturado ao solo (aplicação). CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	68
10	Número de colônias x 10 <sup>4</sup> de bactérias, fungos e actinomicetos por grama de solo com e sem plantas de caupi (média de 3 repetições). CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	76

11	Mortalidade acumulada de larvas de <i>C.aeneus</i> , pulverizadas com <i>B. bassiana</i> , número de larvas com infecção confirmada e tempo letal (LT) 50 e 90%, após 12 dias da inoculação. CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	77
12	Mortalidade acumulada de larvas de <i>C.aeneus</i> , pulverizadas com três diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , número de larvas com infecção confirmada e taxa de potência. CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	79
13	Mortalidade acumulada de larvas de <i>C.aeneus</i> , pulverizadas com três dosagens de diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , número de larvas com infecção confirmada e taxa de potência. CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . . . .	84
14	Mortalidade acumulada de adultos de <i>C. aeneus</i> , pulverizada com três dosagens de diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> e número de adultos com infecção confirmada. CNPAF, Goiânia, GO, 1986. . .	89

ESTABILIDADE DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN (HYPHOMYCETES)  
NO SOLO E SUA PATOGENICIDADE AO *Chalco~~o~~dermus aeneus* BOHEMAN  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), PRAGA DO CAUPI

Autor: ELIANE DIAS QUINTELA

Orientador: DR. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram: determinar os efeitos da temperatura, saturação de água e microrganismos na estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILLEMIN no solo, em condições de laboratório; avaliar a persistência deste fungo em condições de campo, quando aplicado na superfície do solo com e sem plantas de caupi ou misturado no solo desnudo, assim como, verificar a patogenicidade de 5 isolados de *B. bassiana* a larvas e adultos de *Chalco~~o~~dermus aeneus*, Boheman, em laboratório. Os resultados mostraram que a sobrevivência dos conídios de *B. bassiana* em solo autoclavado e não autoclavado diminuiu conforme aumentou a temperatura e percentagem da saturação de água. O número de colônias produzido pelo fungo em solo autoclavado e não autoclavado aumentou com o tempo nas temperaturas de  $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  a 25% da saturação de água, indicando desenvolvimento saprofítico de *B. bassiana* no solo. O número de colônias

de *B. bassiana* em solo autoclavado a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 25% da saturação de água foi inferior ao do solo não autoclavado, quando decorridos 38 dias da inoculação. O número de colônias de fungos e actinomicetos foi maior em solo autoclavado quando comparado ao solo não autoclavado. O número de colônias de bactérias e actinomicetos foi menor em solo inoculado com *B. bassiana* quando comparado ao solo não inoculado, indicando que este fungo tem efeito adverso sobre esses microrganismos.

O solo com planta de caupi constitui ambiente mais favorável à manutenção de conídios de *B. bassiana*, quando comparado ao solo sem cobertura, sendo importante a adoção de práticas culturais que propiciem maior cobertura do solo. O modo de aplicação de *B. bassiana* no solo, não afetou sua sobrevivência em condições de campo, sendo a temperatura do solo um dos principais fatores que afetou a permanência desse fungo em condições de campo. O número de colônias de microorganismos em solo com e sem plantas de caupi não foi significativamente diferente para bactérias, fungos e actinomicetos.

Para os testes de patogenicidade, os isolados CP<sub>1</sub>, CP<sub>5</sub> e CP<sub>7</sub> de *B. bassiana* foram mais patogênicos para larvas de *C. aeneus*, enquanto que o isolado RS 285 foi mais eficiente no controle dos adultos. Entretanto, os isolados testados em larvas mostraram-se menos patogênicos aos adultos.



STABILITY IN SOIL OF *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN (HYPHOMYCETES)  
AND ITS PATHOGENICITY TO *Chalcodermus aeneus* BOHEMAN  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), A PEST OF COWPEA

Author: ELIANE DIAS QUINTELA

Adviser: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

The objectives of this study were to determine the effects of temperature, water saturations and microbes on the stability of *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILLEMIN in soil under laboratory conditions; to evaluate its persistence under field conditions when applied to the soil surface, with and without cowpea plant cover, or mixed into bare soil; and to compare the pathogenicity of 5 *B. bassiana* isolates to larval and adult *Chalcodermus aeneus*, Boheman, in the laboratory. The results show that survival of *B. bassiana* conidia in both autoclaved and unautoclaved soil is lowest at high temperature and wetness. The number of colonies produced by the fungus from both soil preparations increased over time at temperatures of 17 and 24°C and 25% saturation, indicating saprophytic growth in the soil. At 24°C and 25% saturation, the number of colony forming units was lower in autoclaved soil than in unaltered soil 38 days

after inoculation. The number of fungus and actinomycetes colonies produced was greater in autoclaved than in unautoclaved soil. Soil inoculated with *B. bassiana* produced less colonies of bacteria and actinomycetes than uninoculated soil, indicating an inhibition of these organisms by the fungus.

Soil under cowpea plants was more conducive to conidia survival than bare soil, indicating the importance of cultural practices that maximize soil cover. The soil application method did not influence the survival of *B. bassiana* spores in the field, temperature being the most important factor. The number of bacteria, fungi and actinomycetes in the soil did not differ between plots, with and without cowpea plants.

In pathogenicity assays, isolates CP<sub>1</sub>, CP<sub>5</sub> and CP<sub>7</sub> were the most efficacious for larval *C. aeneus* while RS285 was most pathogenic to adults. Pathogenicity to larvae was greater than that to adults for all isolates tested.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão caupi ou macassar, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é amplamente cultivado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo que nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Amazonas a quase totalidade (95-100%) das áreas com feijão são cultivadas com essa espécie. Nos outros estados dessas regiões estima-se produção expressiva de caupi e sua importância torna-se crescente como alimento, não somente por suas excelentes propriedades nutricionais, mas também pela sua adaptabilidade a condições extremas de seca do Nordeste e de alta umidade do Norte.

O caupi constitui ainda alimento importante às populações de outros países da América do Sul e Central. Reporta-se que no Panamá 90% do feijão produzido constituem-se da espécie *Vigna* (NEVES e WATT, 1981), enquanto no Brasil a área de caupi corresponde a 34% do total sob plantio, com uma produção estimada em 16,8% do total de feijão produzido

no país<sup>1</sup>.

A incidência do manhoso, *Chalcodermus aeneus* Boheman, constitui uma das principais limitações na produção de caupi para o consumo humano, sob diversas formas (vagens, feijão verde ou grão seco). É conhecido através das Américas como praga importante em todas as áreas onde o caupi é produzido. O dano causado pelo inseto resulta no desenvolvimento de larvas nos grãos e em perfurações das vagens pelos adultos, reduzindo sua qualidade e comercialização.

O manhoso é considerado a principal praga do caupi no sul dos Estados Unidos. Os danos causados pelo inseto constituem prejuízos consideráveis à indústria de beneficiamento e processamento de vagens, fazendo com que o produto seja considerado inaceitável ao consumo humano (CUTHBERT e FERY, 1975).

O controle dessa praga tem sido feita pela aplicação de inseticidas, os quais vem se mostrando eficientes, porém apresentam sérios problemas de resíduos, além de serem tóxicos e poluentes.

Os entomopatôgenos tem sido apontados como alternativa viável nas tentativas de redução do emprego de inseticidas químicos. Sua compatibilidade com outras táticas de manejo integrado de pragas, aliada às características vantajosas de especificidade e segurança ao homem e outras for

---

<sup>1</sup>Dados obtidos no Setor de Sócio-Economia do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (EMBRAPA), em Goiânia, GO, não publicados.

mas de vida, tem encorajado pesquisas no sentido de utilizá-los como inseticidas microbianos para complementar a ação de parasitas e predadores (HEIMPEL, 1965; ROBERTS e YENDOL, 1971; FRANZ, 1971; BURGESS e HUSSEY, 1971; BURGESS, 1981).

Dentre os patógenos de insetos, os fungos são os agentes mais freqüentemente observados, causando epizootias numa grande diversidade de espécies pragas por todo o mundo. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, possivelmente devido a sua distribuição mundial e abrangente espectro de hospedeiros é um dos fungos mais registrados e estudados (MOSCARDI, 1983; ALVES, 1986), apresentando efetivo potencial para controle de insetos pragas habitantes do solo (FERRON, 1978).

Vários autores têm mencionado a importância do solo como reservatório de fungos entomopatogênicos (IGNOFFO et alii, 1975; SPRENKEL e BROOKS, 1977; IGNOFFO et alii 1978) como meio de armazenamento (BAKERSPIGEL, 1953) e como um dos habitats mais promissores para o desenvolvimento de fungos patogênicos no controle de insetos (ROBERTS e YENDOL, 1971; ROBERTS e CAMPBELL, 1977; ALVES, 1986).

Estudos para avaliar a patogenicidade de *B. bassiana* ao *C. aeneus* bem como dos fatores que afetam a estabilidade deste fungo no solo constituem necessidade básica da pesquisa, não apenas pela importância dessa interação fungo, solo e inseto mas, principalmente, pela grande importância dessa praga a cultura do caupi.

O presente trabalho teve por objetivo:

- Estudar os efeitos de temperatura, conteúdo de água do solo e microrganismos na estabilidade de *B. bassiana* no solo, em laboratório.
- Avaliar a persistência de *B. bassiana* no solo, em condições de campo.
- Verificar a patogenicidade de *B. bassiana* a larvas e adultos, de *C. aeneus* em laboratório.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Práticas de controle biológico de pragas tem sido extensivamente relatadas na literatura, tendo recebido grande ênfase no Brasil nos últimos anos. Dentre os diversos mecanismos discutidos, o uso de fungos entomopatogênicos já se comprovou eficiente, estabelecendo-se como solução viável no controle de insetos.

O estudo de estabilidade de fungos no solo com vistas ao controle de insetos pragas, torna-se essencial devido aos prejuízos causados pelas larvas às sementes recém germinadas, plântulas, raízes, nódulos e também por ser o solo necessário para completar seu desenvolvimento.

Segundo KÜHNELT (1963) é raro um grupo de artropodo que não é encontrado no solo e este autor menciona ainda que é significativa a afirmação de Buckle (1921) de que aproximadamente 95% de todos os insetos passam pelo me

nos uma parte de sua vida dentro do solo. O tempo de permanência dos insetos no solo e sua atividade metabólica é muito variável. Alguns entram no solo para se abrigar enquanto outros encontram no solo ambiente propício para as suas transformações biológicas.

Nesse ambiente, fatores como temperatura, umidade, radiação, microrganismos, matéria orgânica e adubação, atuam de forma decisiva na permanência e, conseqüentemente, na viabilidade de fungos entomopatogênicos.

### 3.1. Efeito de fatores bióticos e abióticos na estabilidade de fungos entomopatogênicos.

#### 3.1.1. Efeito da temperatura e umidade

A sobrevivência de conídios de *B. bassiana* armazenados a várias temperaturas, umidade relativa, conteúdo de água no solo e regimes de pH, em solo esterilizado e não esterilizado, foi primariamente dependente da temperatura e conteúdo de água (LINGG e DONALDSON, 1981). A meia vida dos conídios variou de 14 dias (a 25°C e 75% da saturação de água) a 276 dias (a 10°C e 25% da saturação de água). Conídios mantidos a -15°C exibiram pouca ou nenhuma perda na viabilidade, independente do conteúdo de água, umidade relativa ou pH. Em solos mantidos a 55°C os conídios não foram recuperados após 10 dias.

FARGUES e ROBERT (1985) estudaram a persistên



cia de 4 hifomicetos entomopatogênicos no solo com um método de biodegradação usando uma técnica de armadilha a 19°C. Inóculo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Nomuraea rileyi* (Forlow) Samson, *Paecilomyces fumosoroseus* Wize e *B. bassiana*, foram substancialmente degradados após 6 meses de incubação (70-80% de perda de peso seco). Entretanto, a atividade de uma das raças de *M. anisopliae*, permaneceu ao nível inicial após 21 meses, demonstrando que a persistência de conídios depende da raça do fungo. Os autores comentaram também que a formação microcíclica de conídios poderia estar relacionada com alta sobrevivência de conídios desta raça de *M. anisopliae*.

Segundo MILNER e LUTTON (1976) a sobrevivência de conídios de *M. anisopliae* no solo a 15°C e 23°C não foi significativamente diferente após 547 dias de armazenamento. Imprevisivelmente, a persistência de conídios no solo diminuiu mais rapidamente a 5°C que a 16°C-23°C. A meia vida dos conídios variou de 250 dias a 30°C a 560 dias a 16°C-23°C. Os autores concluíram, ainda, que resultados obtidos pela contagem de colônias de *M. anisopliae* em placas com meio seletivo e bioensaios foram similares, podendo a contagem de colônias em placas ser usada como uma boa medida de virulência.

Resultados similares foram obtidos quando conídios de fungos foram armazenados ao ar, a diferentes temperaturas. A longevidade de esporos de *B. bassiana*, *Paecilomyces*

*farinosus* e *M. anisopliae* diminuiu quando a temperatura aumentou de 8°C para 25°C (CLERK e MADELIN, 1965).

DAOUST e ROBERTS (1983) armazenaram conídios de 3 raças de *M. anisopliae* a diferentes temperaturas e umidades relativas. A sobrevivência dos conídios foi maior em temperatura moderada e alta umidade relativa (26°C e 97% UR ou 19°C e 97% UR) ou baixa temperatura e baixa relativa (4°C e 0% UR), enquanto que valores intermediários de umidades relativas entre 33 e 75% foram mais letais. Estes resultados assemelham-se aos de CLERK e MADELIN (1965), que observaram maior sobrevivência de esporos de *M. anisopliae* a umidades relativas extremas, sendo os valores médios mais críticos.

Alta umidade relativa é essencial para o sucesso de fungos no controle de insetos, já tendo sido comprovado que tal condição é necessária para esporulação e germinação de esporos de fungos entomopatogênicos. Uma vez que a alta umidade necessária aos patógenos é frequentemente e adequadamente encontrada no solo, esse habitat deve merecer maior ênfase em estudos de controle microbiano (ROBERTS e YENDOL, 1971; FRANZ, 1971; MICROBIAL..., 1979).

Três umidades testadas (25, 40 e 55%) não tiveram efeito na sobrevivência de conídios de *M. anisopliae* no solo (MILNER e LUTTON, 1976). LINGG e DONALDSON (1981), entretanto, mencionam que nas temperaturas de 10°C e 25°C baixa so

brevivência de esporos de *B. bassiana* foi observada a 0, 52 e 75% em relação a 33 ou 100% de umidade relativa e que conteúdo de água no solo de 25% foi menos prejudicial aos esporos de *B. bassiana* quando comparado com 75%.

### 2.1.2. Efeito da radiação solar

A radiação solar é, sem dúvida, um dos fatores que mais afetam a estabilidade de entomopatógenos (IGNOFFO e HOSTETTER, 1977; ALVES, 1980; COUCH e IGNOFFO, 1981) e este fato pode ser responsável por algumas falhas do controle microbiano com fungo (ROBERTS e YENDOL, 1971).

CORREIA (1983) mostrou que a radiação solar tem influência na viabilidade de germinação de conídios de *M. anisopliae* semeados na superfície do solo.

O efeito de radiação solar foi evidenciado em estudos realizados por DAOUST e PEREIRA (1986), tendo os esporos de *B. bassiana* bons níveis de sobrevivência (mais de 75%) após um mês no campo, mantidos a sombra sobre raízes de taiuiã (*Ceratosantes hilariana* COGN). Os esporos expostos diretamente ao sol sobre taiuiã tiveram 35% de sobrevivência após 1 semana de exposição, enquanto que aqueles sobre plantas de caupi ou lamínulas plásticas praticamente não apresentaram viabilidade. Para os esporos de *M. anisopliae* a viabilidade, após 28 dias no campo sobre taiuiã à sombra, foi de 17,3%, sendo inferior àquela de esporos sobre lamínulas

(37,1%). Experimento semelhante foi conduzido mantendo *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre raízes de taiuiã ao sol cam po livre de vegetação, tenda de plástico transparente e ten da de plástico negro. Após 1 mês de exposição as raças de *B. bassiana* apresentaram viabilidade de 38,3 e 35,0%, respec tivamente para CP<sub>5</sub> e BbZ<sub>1</sub>, quando sobre raízes de taiuiã à sombra e praticamente viabilidade nula nas raízes expostas ao sol direto ou protegidas por plástico transparente. Para *M. anisopliae*, os esporos à sombra apresentaram viabilidade de 30,3% aos 14 dias e praticamente nenhum esporo viável foi encontrado nos expostos ao sol direta ou indiretamente (plás tico transparente):

### 2.1.3. Efeito de microrganismos

Microrganismos presentes no solo tem sido men cionados como fatores que afetam a estabilidade de fungos en tomopatogênicos (CLERK, 1969; OLIVEIRA, 1979; MICROBIAL..., 1979; LINGG e DONALDSON, 1981; FARGUES et alii, 1983).

CLERK (1969) demonstrou que o extrato aquoso não esterilizado do solo inibiu a germinação de conídios e crescimento do tubo germinativo dos fungos *B. bassiana* e *P. farinosus*. Extratos da camada mais profunda do solo fo ram menos inibidores que extratos da camada superficial, onde o solo é rico em humus e folhas parcialmente decompostas. As propriedades inibidoras foram reduzidas por autoclavagem e

por filtragem dos extratos. A adição de 1% de dextrose e um extrato aquoso do casulo de *Bombyx mori* L. aumentou a porcentagem de germinação e o crescimento do tubo germinativo dos dois fungos, e também reduziu o efeito inibidor do extrato de solo em conídios de *B. bassiana*.

REISINGER et alii (1977) aplicaram blastosporos de *B. bassiana* cobertos com mineral de argila no solo e obtiveram maior proteção dos blastosporos do fungo pelo decréscimo da atividade bacteriana.

Redução na população de *M. anisopliae* ocorreu em solo não esterilizado, o que não aconteceu com solos esterilizados. Acredita-se que bactérias, por existirem em maior número, foram as principais responsáveis por esta fungistase (OLIVEIRA, 1979).

LINGG e DONALDSON (1981) relataram que a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* em solo não esterilizado corrigido com fontes de carbono, nitrogênio ou combinação de carbono e nitrogênio, foi grandemente diminuída e a perda foi completa em menos de 22 dias, enquanto solo esterilizado tratado da mesma maneira mostrou dramático aumento no número de conídios, demonstrando que *B. bassiana* é capaz de crescer em solo esterilizado. O efeito fungistático em solo não esterilizado corrigido foi devido a *Penicillium urticae*, o qual foi rotineiramente isolado do solo e mostrou produzir um inibidor de *B. bassiana* solúvel em água, identificado por

SHIELDS et alii (1981) como patulín.

FARGUES et alii (1983) estudando a sobrevivência de blastosporos de *B. bassiana* cobertos e descobertos por argila, no solo, relataram que blastosporos descobertos foram inativados após 3 semanas de incubação, enquanto que os cobertos estavam ainda ativos após 2 meses de incubação a 20°C. Essas investigações, segundo os autores, demonstraram a proteção da argila contra a biodegradação dos propágulos do fungo por bactérias e protozoários do solo.

#### 2.1.4. Efeito de pH

A acidez do solo pode afetar patógenos e são numerosos os fungos que podem ser influenciados por esse fator (Müller-Kögler, 1965, citado por FRANZ, 1971).

Entretanto, LINGG e DONALDSON (1981), estudando o efeito de diferentes pH (5,0; 6,0; 7,6) na persistência de conídios de *B. bassiana* no solo, mostraram que o pH teve pouco efeito na sobrevivência de conídios em conteúdos de água no solo de 25, 50 e 75%.

#### 2.1.5. Efeito da matéria orgânica e adubação

OLIVEIRA et alii (1981) estudando a sobrevivência de *M. anisopliae* em diferentes tipos de solo, observaram maior número de propágulos do fungo nos solos com comprovada presença de matéria orgânica. Nesse solo havia sido realizado um experimento de adubação em cana-de-açúcar e incorpora

ção dos restos de cultura.

Entretanto, LINGG e DONALDSON (1981) indicaram que a adição de carbono e nitrogênio e subsequente estimulação da microflora do solo foi prejudicial à sobrevivência de conídios de *B. bassiana*. CLERK (1969) relatou também que extratos da camada mais profunda do solo foram menos inibidores ao fungo *B. bassiana* que extratos da camada superficial onde o solo é rico em humus e folhas parcialmente decompostas.

## 2.2. Desenvolvimento saprofítico de fungos entomopatogênicos

Algumas publicações reportam um possível desenvolvimento de deuteromicetos em pedaços de planta e no solo (Evlákhová, 1974, citado por FERRON, 1978; OLIVEIRA, 1979; LINGG e DONALDSON, 1981; FARGUES e ROBERT, 1985).

OLIVEIRA (1979) menciona que a taxa de infestação de  $1,41 \times 10^6$  esporos viáveis de *M. anisopliae* por grama do solo foi suficiente para manter este microrganismo, de uma maneira saprofítica, por um período mínimo de 90 dias.

LINGG e DONALDSON (1981) observaram aumento no número de conídios de *B. bassiana* em solo esterilizado, corrigido com quitina, uréia, tartarato de amônio e combinações de carbono e nitrogênio, sendo que, em muitos casos, o crescimento micelial estava presente na superfície do solo, ao final do experimento.

Em levantamento efetuado por ALVES (1986), verificou-se em culturas de banana o *Cosmopolites sordidus* atacado por *B. bassiana*. Ao redor do inseto, observou-se uma grande quantidade de micélio com o formato de "rizomorfa", sendo que essa estrutura, segundo o autor, pode ser uma das formas de perpetuação do fungo no solo.

### 2.3. Persistência de fungos entomopatogênicos no solo em condições de campo

O tempo de sobrevivência de fungos entomopatogênicos no solo pode variar de poucos dias a anos, dependendo da espécie do fungo, das fases de desenvolvimento do patógeno, das condições particulares do solo e dos fatores abióticos.

LATCH e FALLON (1976) mencionaram que esporos de *M. anisopliae* sobreviveram no material de reprodução de *Oryctes rhinoceros* L. por pelo menos 24 meses, com sobrevivência não grandemente afetada pelo tipo de material de reprodução ou por fatores sazonais.

OLIVEIRA et alii (1981) estudando a sobrevivência de esporos de *M. anisopliae* em diferentes tipos de solos, esterilizados ou não, em condições de casa de vegetação, relataram que os esporos de *M. anisopliae* têm potencial de sobrevivência por um período mínimo de 90 dias.

O isolamento de *B. bassiana* do solo mostrou



metade do inóculo presente após 2 semanas, quando foram utilizados conídios e, um quarto de inóculo, quando se utilizaram blastosporos para controlar pupas de *Leptinotarsa decemlineata* SAY no solo (WATT e LeBRUN, 1984).

GOTTWALD e TEDDERS (1984) estudando a colonização, transmissão e longevidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *Curculio caryae* HORN no solo, demonstraram que colônias de *B. bassiana* alcançaram máximo diâmetro (9,55 cm) 90 a 120 dias após a 1ª larva ter sido infectada, enquanto que colônias de *M. anisopliae* ficaram restritas ao cadáver da larva.

Vários trabalhos tem sido desenvolvidos para explicar a ocorrência de epizootias de *N. rileyi* em lagartas da soja. IGNOFFO et alii (1977) relataram que plântulas de soja foram contaminadas em solo inoculado com conídios de *N. rileyi*. Embora *N. rileyi* fosse detectada no 1º trifolíolo, a maioria do inóculo foi encontrado no cotilédone. Os autores atribuíram ao solo o papel de reservatório natural para início de epizootias de *N. rileyi* em lagarta da soja. Através deste trabalho eles puderam identificar a provável sequência de eventos que resulta no ciclo epizoótico de *N. rileyi*: contaminação do solo, no outono, por conídios em larvas mortas infectadas com *N. rileyi*; na primavera, transmissão de conídios mantidos no solo para plantas de soja germinantes no campo; no verão, transmissão de *N. rileyi* a larvas suscetíveis que se alimentam das partes contaminadas da planta no

início da estação e, finalmente, dispersão de *N. rileyi* através das plantas por larvas infectadas.

Escleródios produzidos em laboratório sobre cadáveres mumificados de *Heliothis virescens* FABR. e conídios de *N. rileyi* foram mantidos em condições de campo pelo período de 10 meses. Os conídios foram infecciosos após terem sido mantidos na superfície do solo por 30 dias. Cadáveres mantidos na superfície do solo começaram a esporular após 47 dias. Conídios infecciosos foram encontrados nestes cadáveres por um período de amostragens de 281 dias. Conídios infecciosos foram também encontrados nos cadáveres colocados a 10 cm no solo, decorridos 194 dias (SPRENKEL e BROOKS, 1977).

A meia vida dos conídios de *N. rileyi*, dentro e na superfície do solo, foi respectivamente 90 e 65 dias. Após 11 dias de exposição, 10% da infectividade foi perdida nas amostras dentro e na superfície do solo. Depois de 350 a 450 dias, 99% da infectividade foi perdida nas amostras dentro e na superfície do solo (IGNOFFO et alii, 1978).

#### 2.4. Patogenicidade de fungos a insetos no solo

Teste em laboratório e em pequena escala no campo indicaram que fungos entomopatogênicos, principalmente *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *M. anisopliae*, têm bom potencial para controle de insetos que habitam o solo (MICROBIAL..., 1979).

Esporos de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Nomuraea* (= *Spicaria*) *rileyi*, em pó, foram aplicados topicamente a larvas de *C. aeneus* ou misturados ao substrato do solo ou areia, por BELL e HAMALLE (1970). Altas concentrações de *N. rileyi* ( $9,87 \times 10^{11}$  esporos/g de substrato) não foram capazes de controlar o inseto até 14 dias, mas *M. anisopliae* ( $1,11 \times 10^{11}$  esporos/g de substrato) e *B. bassiana* ( $1,86 \times 10^{11}$  esporos/g de substrato) mataram 100% das larvas em 6 e 7 dias respectivamente. Além disso, *M. anisopliae* e *B. bassiana* contidos nesses substratos foram deixados secar ao ar por 40 dias e ainda foram capazes de infectar larvas recém introduzidas e causar 100 e 80% de mortalidade, respectivamente. Dados do teste de campo indicaram que larvas de *Chalcodermus*, enterradas a 2,5 cm em solo tratado com esporos de *M. anisopliae*, foram infectadas (88% de mortalidade) e moveram-se ao solo abaixo não tratado. Os dados obtidos pelos autores são justificáveis, já que os mesmos utilizaram uma super dosagem dos patógenos.

Aplicação de *B. bassiana* no solo foram efetivas em controlar a 1ª e 2ª gerações de pupas de *L. decemlineata*, com 74% e 77% de redução, respectivamente. Conídios foram superiores a blastosporos em reduzir a emergência de adultos, mas não produziram diferença significativa no índice da doença dos adultos levados ao laboratório (WATT e LeBRUN, 1984).

BELL et alii (1972) aplicaram esporos de *M.*

*anisopliae*, *B. bassiana* e *N. rileyi* em larvas do 3º instar e pupas de *Diabrotica balteata* LeCONTE em 3 tipos de substratos autoclavados. Após 7 dias de exposição de *B. bassiana*, a mortalidade larval foi de 100, 94 e 81% para solo, areia e areia lavada, respectivamente. Durante o mesmo período o *Metarhizium* causou 75% de mortalidade larval no solo e somente 60 e 62% em areia e areia lavada. *Nomuraea* causou baixa mortalidade nesse mesmo período. *B. bassiana* provocou 100% de mortalidade de pupas, após 7 dias no solo e em areia, e 94%, em areia lavada. *Metarhizium* matou 100% de pupas no mesmo período, em todos os substratos e *Nomuraea* foi totalmente ineficiente contra este estágio do inseto.

Larvas de *Oryctes monoceros* infectadas por *M. anisopliae* morreram após 3 semanas a 28°C, quando o substrato de reprodução foi infectado com conídios ( $10^3$  por grama de composto). A temperatura teve uma grande influência no desenvolvimento da doença, e a intensidade máxima alcançada estava entre 25 e 30°C. A 35°C, o fungo não se desenvolveu; abaixo de 25°C, a infecção progrediu lentamente, mas a mortalidade foi total (DIOMANDE, 1969).

LATCH e FALLON (1976) testaram *M. anisopliae* em experimentos contra *Oryctes rhinoceros* em diferentes tipos de substrato de reprodução. A mortalidade das larvas após aplicação do inóculo de areia contendo o fungo foi de 100, 80 e 30% quando a dose de inóculo usada foi de 1390 a 139,56 e 13,9 g/m<sup>2</sup>, respectivamente.

TEDDERS et alii (1973) avaliaram o efeito de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Neoplectana carpocapsae* (= *dutkyi*) JACKSON como patógenos de larvas de *C. caryae* no laboratório e campo. Tratamentos realizados com estes patógenos aumentaram significativamente a mortalidade de larvas no experimento de campo, após 20 dias do tratamento do solo.

FERRON (1974) realizou ensaios para controle de *Melolontha melolontha* L. pelo tratamento do solo com blastosporos de *B. brongniartii* (= *tenella*). Este autor determinou que parcelas tratadas com *B. brongniartii*, com ou sem doses reduzidas de inseticidas, tiveram mais insetos infectados do que aquelas não tratadas e onde somente ocorria a doença naturalmente.

Ainda FERRON (1977), usando *B. brongniartii* em *M. melolontha*, obteve melhores resultados quando inoculou uma suspensão de  $20 \times 10^9$  conídios/m<sup>2</sup> de solo. O desenvolvimento de epizootias no campo ocorreu 16 meses após inoculação no solo e a doença persistiu até a geração seguinte.

Em geral, as dosagens de patógenos utilizadas nos experimentos referidos são muito altas, justificando a necessidade de intensificar estudos, visando melhorar a eficiência desses patógenos à nível de campo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no laboratório de patologia dos insetos, casa de vegetação e no campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, CNPAF/EMBRAPA em Goiânia, GO.

#### 3.1. Efeito da temperatura, conteúdo de água no solo e microrganismos na estabilidade de *B. bassiana* em condições controladas

##### 3.1.1. Fungo utilizado

A cepa de *B. bassiana* utilizada no experimento foi isolada de *Cerotoma arcuata* OLIV. (Coleoptera: Chrysomelidae) na localidade Costa do Surubin, Estado do Amazonas, por Richard A. Daoust, recebendo a denominação de CP<sub>5</sub> fazendo parte da micoteca do laboratório de Patologia de Insetos do CNPAF.

### 3.1.2. Produção de conídios

Utilizou-se 0,1 ml de uma suspensão contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  conídios/ml para inocular placas de Petri, de 90 x 20 mm, contendo meio a base de batata, dextrose, agar e extrato de levedura. As placas foram incubadas a 27°C e, após 14 dias, os conídios foram coletados e passados através de peneiras de malha de 425 µm e 250 µm. Os esporos obtidos foram armazenados a 4°C, no escuro, até o uso.

### 3.1.3. Solo

O solo utilizado no experimento, terra roxa estruturada latossólica eutrófica, foi coletado a 5 cm de profundidade na área experimental do CNPAF, onde se cultivava caupi. Após a coleta, o solo foi seco ao ar em casa de vegetação, por uma semana, e passado em peneira de malha de 2 mm. O solo foi esterilizado, quando necessário, por autoclavagem a 121°C, por 2 horas.

### 3.1.4. Análise química e física do solo

As características químicas e físicas do solo usado no experimento e as características químicas de amostras de solo autoclavado e não autoclavado foram determinadas logo após coleta, no laboratório de análise de solos do CNPAF (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo estudado, terra roxa estruturada latossólica eutrófica, e características químicas de amostras deste solo autoclavado (a 121°C durante 2 horas) e não autoclavado. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fatores Analisados	Resultados Analíticos		
	Solo utilizado no experimento	Solo Não Autoclavado*	Solo Autoclavado*
pH em água (1:2,5)	5,40	6,40	6,40
Ca <sup>++</sup> + Mg <sup>++</sup> (mE/100mℓ)	1,80	3,50	3,70
Al <sup>+++</sup> (mE/100mℓ)	0,30	0,10	0,10
P (ppm)	3,30	1,10	1,80
K <sup>+</sup> (ppm)	62,00	274,00	287,00
Matéria orgânica (%)	0,90	1,20	1,20
Cu (ppm)	0,00	2,20	1,80
Zn (ppm)	2,30	2,00	2,00
Fe (ppm)	192,00	148,00	124,00
Mn (ppm)	40,00	31,00	34,00
Argila %	53,76	-	-
Silte %	13,28	-	-
Areia %	32,96	-	-
Classe textural	Argila	-	-

\*Solo coletado posteriormente no mesmo local do solo utilizado no estudo.



3.1.5. Meio seletivo para isolar *B. bassiana* do solo

Ensaíos preliminares foram conduzidos para determinar o meio seletivo mais apropriado para isolar *B. bassiana* do solo.

Em condições assépticas, conídios do fungo foram adicionados ao solo não autoclavado ( $10^9$  conídios/g de solo; 1g de conídios =  $10^{11}$  conídios) e este solo foi utilizado para fazer diluições de  $10^{-1}$  (10 g de solo em 90 ml de água esterilizada) até  $10^{-7}$ . Aliquotas de 0,1 ml de diluições decimais desse solo foram plaqueadas nos seguintes meios seletivos:

## - PEREIRA et alii (1979)

Agar (Bacto-Difco)	20 g
Neopeptone	6 g
Glucose	10 g
$K_2HPO_4$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0 g
Água destilada	1,0 l
pH regulado a 6,5	

O meio foi autoclavado a  $121^\circ C$  por 20 minutos, esfriado a  $50-55^\circ C$  e corrigido com:

Cycloheximide	200 mg
Cloranfenicol	200 mg
Estreptomicina	100 mg

Eritrocine 80 mg

- JOUSSIER e CATROUX (1976)

Este meio foi testado, sem a adição do suco de oito vegetais da formulação original, com:

Agar (Bacto-Difco)	20 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Extrato de levedura	2 g
Bile de boi (Oxgall)	5 g
Glucose	2 g
Água destilada	1 l

Após autoclavagem a 121°C por 20 minutos foi corrigido com:

Actidione	125 mg
Estreptomicina	500 mg
Tetraciclina	50 mg

- LINGG e DONALDSON (1981)

Este meio foi testado na formulação original e não houve crescimento de colônias de *B. bassiana* devido às altas concentrações dos antibióticos. Três diluições deste meio foram testadas:

	Formulação original	Diluições		
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
Saborauds dextrose agar	65 g	65 g	65 g	65 g

Oxgall (Bile bovino)	15 g	15 g	7,5 g	7,5 g
Água destilada	1 l	1 l	1 l	1 l

Foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e corri  
gido com:

Penicilina	600 mg	300 mg	150 mg	75 mg
Sulfato de estreptomicina	2560 mg	250 mg	125 mg	62,5 mg
Oxytetraciclina	125 mg	62,5 mg	31,25 mg	15,6 mg
Cycloheximide	500 mg	250 mg	125 mg	62,5 mg
KMnO <sub>4</sub>	100 mg	50 mg	25 mg	12,5 mg
Morocide (50% técnico)	1 g	0,5 mg	0,25 mg	0,125 mg

As alíquotas de 0,1 ml das diluições foram es  
palhadas uniformemente na superfície dos meios de cultura  
com uma alça de Drigalsky, a qual foi flambada a cada uso,  
mergulhando em álcool absoluto e em seguida levando ao fogo.  
As placas foram incubadas a 24°C <sup>±</sup> 1. A contagem das colô  
nias do fungo por placa de Petri, efetuada após uma semana  
nas diluições de 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, apresentou diferenças signifi  
cativas para os meios de cultura testados em três repetições  
(Tabela 2). Optou-se por utilizar o primeiro (PEREIRA et  
alii, 1979), pela disponibilidade de ingredientes. Devido a  
alta incidência de contaminantes, depois da 6.<sup>a</sup> avaliação, es  
te meio foi substituído por uma versão modificada do desen  
volvido por LINGG e DONALDSON (1981), conforme a seguinte cons  
tituição:

Tabela 2. Número médio de colônias de *B. bassiana* por placa de Petri em diferentes meios de cultura seletivos (média de 3 repetições). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Meio de Cultura	Número de Colônias/Placa de Petri	
	Diluições <sup>1</sup>	
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
PEREIRA et alii (1979)	73,00 ab	24,50 a
JOUSSIER e CATROUX (1976)	88,30 a	17,00 a
LINGG e DONALDSON (1981) 1 <sup>a</sup> Diluição	92,30 a	6,60 a
LINGG e DONALDSON (1981) 2 <sup>a</sup> Diluição	67,00 ab	7,60 a
LINGG e DONALDSON (1981) 3 <sup>a</sup> Diluição	51,30 b	8,00 a

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Saboraud dextrose agar	65 g
Oxgall	10 g
Água destilada.	1 l

Meio autoclavado a 121°C durante 30 minutos e corrigido com:

Oxytetraciclina ou terramicina	80 mg
Cycloheximide	250 mg
KMnO <sub>4</sub>	50 mg
*Combiotic	2 ml

\* Preparação do combiotic: 0,8 ml de penicilina (10<sup>6</sup> U/ml) e 3,2 ml de água destilada foram adicionados em frasco contendo 1 g de estreptomicina (250 mg/ml)

### 3.1.6. Determinação da percentagem de saturação de água no solo

A determinação da percentagem de saturação de água no solo foi realizada através do método "terra fina seca ao ar" (T.F.S.A.) descrito pelo manual de métodos de análise de solo da EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (1979), sendo o valor encontrado de aproximadamente 50 ml de H<sub>2</sub>O/100 g de solo seco.

### 3.1.7. Procedimento experimental

Para estudar os efeitos da temperatura, do conteúdo de água e de microrganismos do solo, utilizaram-se temperaturas de 17 ± 1°C; 24 ± 1°C e 30 ± 1°C e percentagem da satu

ração de água de 25 e 75, em solo autoclavado e não autoclavado, inoculados com conídios de *B. bassiana*. Cada tratamento, combinação de temperatura e % da saturação, em 3 repetições com 700 g de solo/repetição, foi adicionado com 0,21 g de conídios de *B. bassiana*, representando aproximadamente  $3 \times 10^7$  conídios/g de solo, em recipientes tampados (14 cm de comprimento x 8 cm de largura e 12,5 cm de altura). Os recipientes, contendo solo e conídios, foram agitados manualmente para garantir homogeneidade na mistura. Antes da inoculação de *B. bassiana*, amostras de solo não autoclavado foram testadas para verificar a existência de *B. bassiana*, tendo sido comprovada a ausência do fungo.

Para fornecer as percentagens de saturação, determinou-se, primeiramente a umidade do solo, pesando-se 400g de solo após a secagem em estufa a 105°C durante 24 horas:

$$\text{Umidade do solo} = \frac{U_u - U_s}{U_s}$$

$U_u$  = peso inicial do solo

$U_s$  = peso seco do solo

$$U = \frac{400 - 393}{393} = 0,018 \text{ g de água/g de solo}$$

Para fornecer 75% da saturação de água em 700 g de solo calcula-se:

50 ml de água/100g de solo = 100% de saturação

350 ml de água — 100%

x — 75%

x = 262,5 ml de água

Descontando a quantidade de água existente nos 700 g de solo tem-se que:

$$262,5 - (700 \times 0,018) = 249,9 = 250 \text{ ml de água destilada esterilizada/700g de solo.}$$

Para fornecer 25% de saturação:

$$87,5 \text{ ml de água} - 12,6 = 74,9 = 75 \text{ ml de água destilada esterilizada/700 g de solo.}$$

Os recipientes, com solo e as percentagens da saturação desejadas, foram pesados semanalmente para verificar se havia perda ou não de água. Os recipientes que perdiam peso eram completados, com água destilada esterilizada, para seu peso inicial. Estes recipientes foram incubados a  $17 \pm 1$ ;  $24 \pm 1$  e  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  em estufa B.O.D. ("Biological Oxygen Demand"). A temperatura média dentro da estufa foi medida através de um higrotermôgrafo eletrônico (Datapod modelo DP 220, OMNIDATA International, INC. P.O. Box 3489, LOGAN, Utah 84321, U.S.A.).

As avaliações de *B. bassiana* no solo foram realizadas aos 0, 8, 24, 38, 52, 80 e 129 dias após a inoculação do fungo. Amostras de solo de 11,1 g para os tratamentos com 25% da saturação e 13,6 g para os com 75% foram retiradas ao acaso das repetições dos tratamentos, com uma espátula, para fazer-se diluições decimais. Plaqueou-se 0,1 ml das diluições de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em meio seletivo na 1.<sup>a</sup> avaliação, em 3 repetições por diluição. Para as avaliações

seguintes foram plaqueadas duas diluições em níveis capazes de expressar a presença de conídios nos solos. As placas foram incubadas por 7 a 9 dias a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , quando se procedia a contagem da quantidade de colônias, expressando-se o resultado em número de colônias/g de solo seco.

\* Para as análises estatísticas dos resultados obtidos utilizou-se a análise de variância para cada avaliação e para o conjunto de avaliações. A persistência do fungo foi também avaliada graficamente.

### 3.1.8. Análise de microrganismos do solo

As observações foram realizadas para a temperatura de  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 25% da saturação do solo autoclavado e não autoclavado contendo *B. bassiana*. As testemunhas (sem inóculo do fungo) foram mantidas nas mesmas condições, em duas repetições, cada repetição com 700g de solo. As avaliações de fungos, bactérias e actinomicetos presentes no solo foram efetuadas aos 0, 8, 24, 38, 52, 80 e 129 dias após a implantação do experimento, adotando-se metodologia desenvolvida por DAZZO (s/d).

Em condições assépticas foram preparadas diluições decimais de cada repetição. Em seguida, alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para as superfícies de placas de Petri das diluições de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , para isolar bactérias com meio de cultura constituído de:

Agar

15 g



D-Glucose	1 g
Extrato de levedura	0,1 g
$K_2HPO_4$	0,5 g
*Extrato do solo	200 ml
Água destilada	800 ml
pH (ajustado antes de autoclavar)	6,8-7,0

\*O extrato de solo foi preparado pela autoclavagem de 1000 g de solo e 1 g de  $CaCO_3$  com 1000 ml de água destilada a  $121^\circ C$  durante 30 minutos. A suspensão obtida foi centrifugada a 40.000 rpm durante 30 minutos, para melhor clarificação, sendo usado o sobrenadante.

Para isolar fungos do solo foram utilizadas diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  com meio de batata dextrose agar/cloranfenicol + tetraciclina e para actinomicetos, diluições de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  com meio de agar + água destilada (1,5%).

Das amostras diluídas, 0,1 ml foi espalhado uniformemente na superfície do agar com uma alça de Drigalsky, a qual foi esterilizada a cada uso. Três placas por diluição, foram incubadas a  $24^\circ C \pm 1$ . A contagem das colônias de bactérias e actinomicetos (30-300/placa) foi efetuada após 6-7 dias e as colônias do fungo (20-50/placa) após 4-5 dias. Os resultados foram expressos em números de colônias/g de solo seco.

A análise de variância foi conduzida para cada avaliação e no conjunto de avaliações. A presença dos microorganismos também foi avaliada graficamente.

### 3.2. Estabilidade de *B. bassiana* em condições de campo

#### 3.2.1. Procedimento experimental

Os trabalhos de campo foram iniciados dia 25.02.1986, com a montagem dos seguintes tratamentos.

a. *B. bassiana* pulverizado na superfície do solo com plantas de caupi.

b. *B. bassiana* pulverizado na superfície do solo desnudo.

c. *B. bassiana* pulverizado na superfície e misturado ao solo desnudo (nos 5 cm).

d. Testemunha - sem *B. bassiana*.

Em parcelas de 0,75 x 0,5 m foram pulverizadas, com o pulverizador constante da Figura 1, 0,35 g de conídios de *B. bassiana* em 80 ml de Tween 0,1%. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 6 repetições (Figura 2). No tratamento com plantas de caupi, utilizou-se a variedade CNCx 252-1E, plantada em 08.11.85 no espaçamento de 75 x 20 cm, tendo 6 a 7 sementes por metro linear.

As avaliações foram efetuadas aos 0, 9, 17, 24, 38, 45, 52, 59, 73, 80, 94 dias após início do trabalho. As amostras de solo foram retiradas com becker plástico de 150 ml, ao acaso dentro das parcelas, nos 5 cm do solo no tratamento c e na superfície nos tratamentos a, b e d, marcando-se o local onde era retirada a amostra. No laboratório, foram pesadas 10 g de solo de cada repetição dos tratamentos,

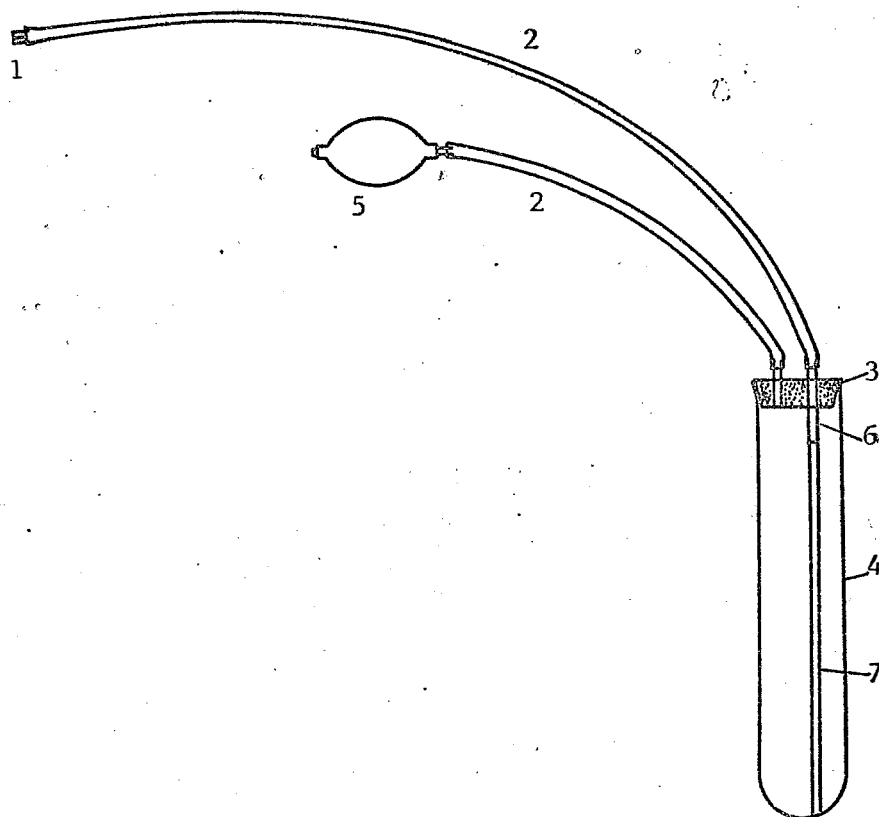


Figura 1. Esquema do pulverizador utilizado para aplicação do fungo. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Legenda:

- 1- Bico de pulverizador de jato contínuo referência 2005 flora
- 2- Mangueira de borracha
- 3- Rolha de borracha
- 4- Tubo de ensaio plástico (10cm comprimento x 2,7cm de diâmetro)
- 5- Pera de borracha (bomba, pressão a ar)
- 6- Tubo de alumínio
- 7. Tubo de plástico.

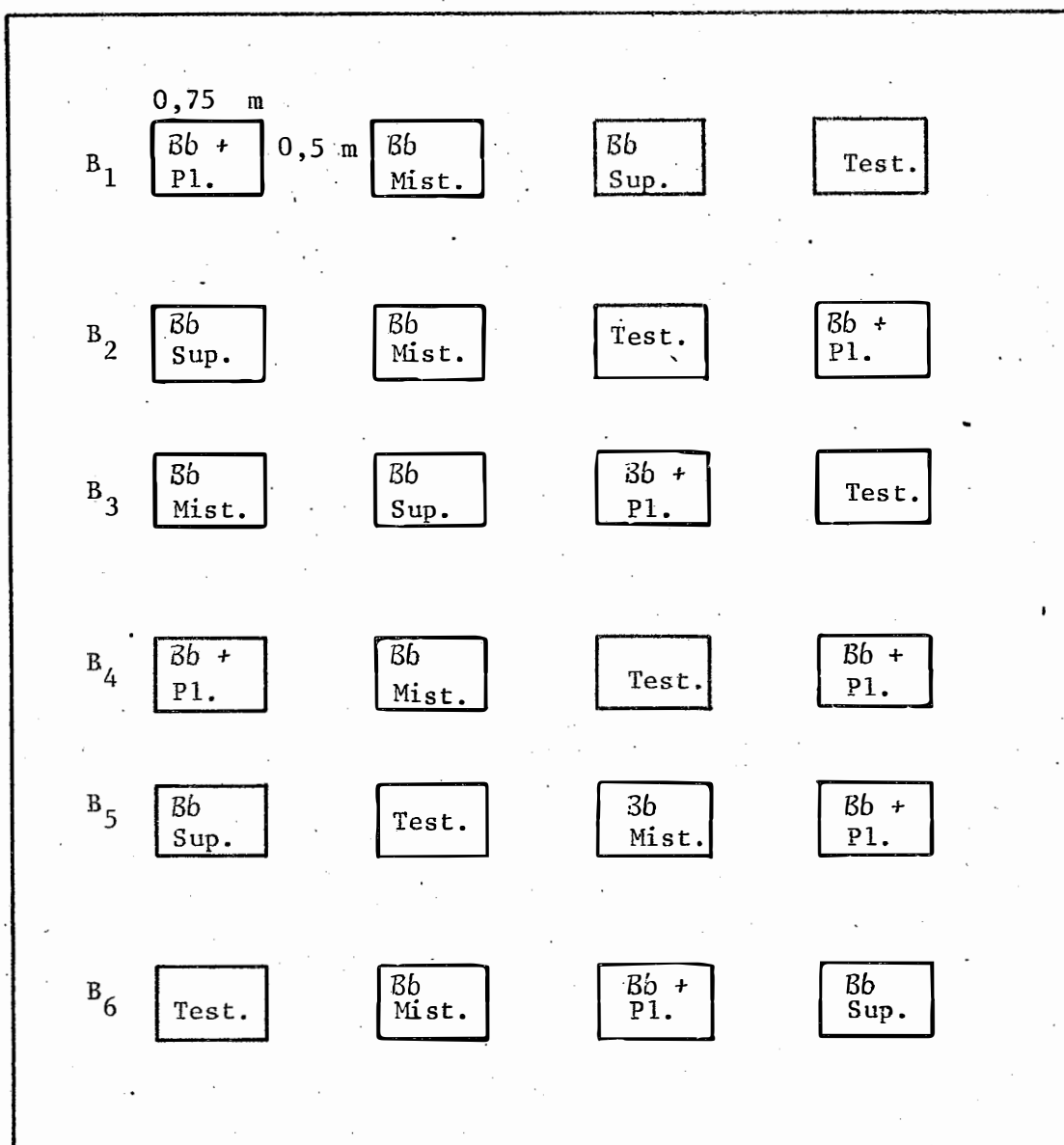


Figura 2. Croqui da área experimental. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Legenda:

Bb + Pl. - *B. bassiana* pulverizado na superfície do solo com plantas.

Bb. Mist. - *B. bassiana* pulverizado na superfície e mistura do ao solo.

Bb. Sup. - *B. bassiana* pulverizada na superfície do solo.

Test. - Testemunha - sem pulverizar *B. bassiana*.

fazendo-se em seguida diluições decimais e plaqueando-se 0,1 ml das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  na 1.<sup>a</sup> avaliação em meio seletivo de LINGG e DONALDSON (1981) modificado (3 placas/diluição). As avaliações seguintes basearam-se nas anteriores, em diluições capazes de expressar a quantidade de conídios presentes no solo. As placas foram incubadas por 7 a 8 dias a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ , quando se procedia a contagem da quantidade de colônias, expressando-se os resultados em número de colônias por grama de solo. Foi também efetuada uma avaliação de microrganismos em solo com e sem planta, em 3 repetições.

Mediu-se a umidade do solo em parcelas com plantas; através do aparelho eletrônico Datapod modelo 221 OMNIDATA, em intervalos de 60 minutos, e a precipitação pluviométrica através do aparelho Datapod modelo DP 101 OMNIDATA.

Para as análises estatísticas dos resultados, utilizou-se a análise de variância para cada avaliação e para o conjunto de avaliações. A persistência do fungo foi também avaliada graficamente, através de curvas de sobrevivência.

### 3.2.2. Determinação da curva de retenção de água no solo

A determinação da curva de retenção permite estimar a quantidade de água que um solo pode armazenar dentro de determinados limites de sucção mátrica, isto é, a água de

fácil aproveitamento (sucção baixa) e de difícil aproveitamento (sucção alta) (FORSYTHE, 1975).

A umidade no solo foi determinada pela estimativa da curva de retenção de água, em diferentes níveis de pressão. Aos diferentes níveis de pressão correspondem a leituras de umidade do solo, em atmosferas, fornecidas pelo aparelho Datapod modelo DP 221, OMNIDATA.

Foram utilizados aparelhos de pressão e placa porosa de RICHARDS (1974) para as tensões de 0,1 a 15 atmosferas e mesa de tensão de OLIVEIRA (1968) para as tensões de 0,01 a 0,06 atmosferas, para determinar a curva de retenção de umidade nas amostras de solo da área experimental do CNPAF, onde foi realizado o experimento de campo.

As amostras do solo, com estruturas deformadas (T.F.S.A.), retiradas de 0 a 20 cm, foram saturadas com água diretamente sobre os aparelhos empregados nas determinações, sendo depois submetidas às extrações, sob as tensões de 0,01; 0,03; 0,06; 0,1; 0,3; 0,7; 1,0; 3,0; 5,0; 10 e 15 atmosferas. Após atingir o equilíbrio de cada tensão aplicada, as amostras, em triplicata, eram pesadas e secas em estufa, a 105<sup>o</sup> - 110<sup>o</sup>C por 24 horas. Os teores de umidade retidos pelas amostras foram determinados com base no peso seco em estufa e posteriormente transformados em umidade volumétrica, com o auxílio da densidade aparente (MOREIRA, 1982) (Figura 3).

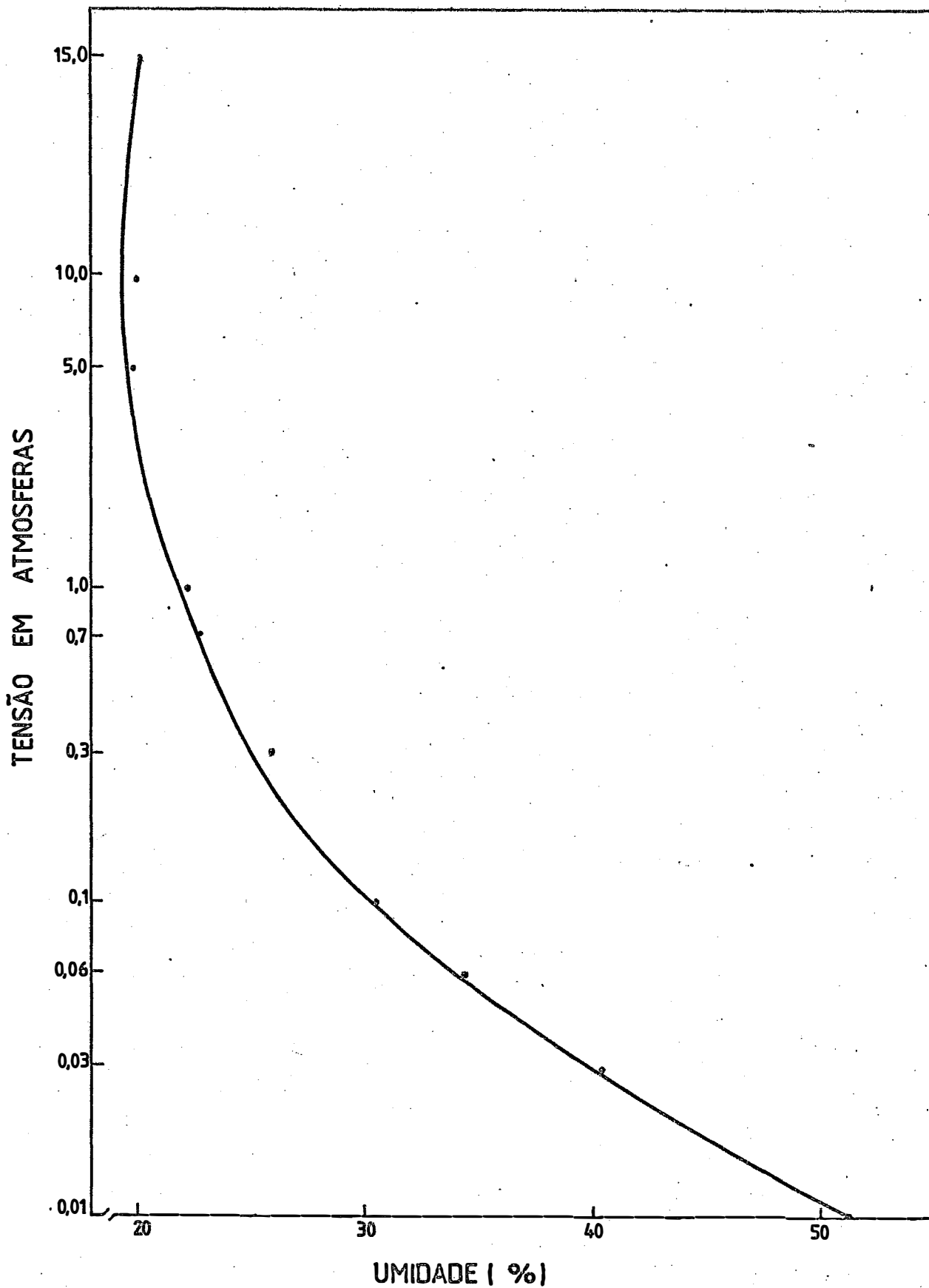


Figura 3. Curva característica de retenção de umidade obtida por secagem de amostras de solo, terra roxa estruturada latossólica eutrófica. (Média de 3 repetições). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

### 3.3. Patogenicidade de *B. bassiana* a larvas e adultos do manhoso, *Chalcodermus aeneus* Boheman

#### 3.3.1. Solo

Utilizou-se, na criação de larvas de manhoso e para os bioensaios, um solo orgânico distrófico, textura argilosa, fase floresta de várzea, relevo plano. As análises químicas do solo orgânico esterilizado (a 160°C durante 4 horas) e não esterilizado foram determinadas logo após a coleta, no laboratório de análise de solos do CNPAF (Tabela 3).

#### 3.3.2. Criação do inseto

Vagens de caupi infestadas por larvas de manhoso foram colocadas em sacos de papel de 26 x 18 cm (50 vagens/saco) e adicionadas em recipientes cilíndricos, com 21 cm de diâmetro por 8 cm de altura, contendo solo orgânico úmido esterilizado no fundo, camada de 2 cm, num total de 100 vagens/ recipiente.

Estes recipientes foram colocados em extrados de madeira em casa de vegetação, devido aos ácaros encontrados nas vagens que poderiam contaminar as criações no laboratório. Diariamente as larvas que desciam ao solo, último instar larval, eram coletadas, colocadas em recipientes de 21 cm de diâmetro por 8 cm de altura contendo solo orgânico úmido esterilizado (aproximadamente 10 cm de solo), e trazidas ao laboratório, onde os recipientes eram cobertos com pano de fi



Tabela 3. Características químicas do solo orgânico distrófico, textura argilosa, esterilizado (a 160° durante 4 horas) e não esterilizado. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fatores Analisados	Resultados Analíticos	
	Solo não Esterilizado	Solo Esterilizado
pH em água (1:2,5)	5,20	4,90
Ca <sup>++</sup> + Mg <sup>++</sup> (mE/100mℓ)	8,50	9,50
Al <sup>+++</sup> (mE/100m )	0,60	2,00
P (ppm)	79,20	93,70
K <sup>+</sup> (ppm)	224,00	256,00
M.O%	6,90	5,90
Cu (ppm)	3,00	3,50
Zn (ppm)	2,40	3,10
Fe (ppm)	47,00	216,00
Mn (ppm)	25,00	47,00

lô, amarrados com atílio de borracha e mantidos até emergência dos adultos. Para facilitar a retirada dos adultos, o solo era passado em peneira (malha de 2 mm) e os adultos colocados em gaiolas de acrílico de forma cilíndrica, (17cm de diâmetro e 34 cm de altura) com tela de arame na parte inferior e pano de filô na parte superior. Vagens verdes trazidas do campo eram adicionadas dentro das gaiolas para alimentação e oviposição dos adultos, sendo transferidas a cada 2 dias aos sacos de papel e recipientes forrados com solo orgânico úmido. Devido ao ressecamento dessas vagens, poucas larvas conseguiam se desenvolver. Para os testes de patogenicidade foram utilizadas larvas provenientes do campo, em último instar larval e adultos emergentes.

### 3.3.3. Fungo utilizado nos bioensaios

Foram utilizadas cinco cepas de *B. bassiana*, para os testes de patogenicidade em laboratório, pertencentes a coleção de entomopatôgenos do CNPAF, as quatro primeiras isoladas por Richard A. Daoust e a última cedida por Donald W. Roberts, Boyce Thompson Institute:

- CP<sub>1</sub> - Isolada de um vespidae (adulto) na Costa do Arapa, Amazonas, Brasil.
- CP<sub>5</sub> - Isolada de *Cerotoma* arcuata na Costa do Surubin, Comunidade de Cristo Rei, Amazonas.
- CP<sub>7</sub> - Isolada de *C. aeneus*, no CNPAF, Goiânia, Goiás.

CP<sub>14</sub> - Isolada de *C.aeneus*, no CNPAF, Goiânia, Goiás.  
RS 285 - Cultura monospórica da formulação de Boverin  
(O. Alyeshiva, Moscou, USSR).

Para determinação da viabilidade dos isolados no início do teste, 0,1 ml de uma suspensão com aproximadamente  $10^4$  conídios/ml, de cada isolado, foi inoculada em placa de Petri (2 placas/isolado) contendo BDAY e incubado a 27°C por 12 horas. As leituras foram efetuadas pela contagem microscópica de 200 esporos por placa, considerando germinado o conídio cujo tubo germinativo fosse facilmente visualizado. Para preparar as suspensões de *B. bassiana*, conídios de cada isolado foram adicionados a soluções de Tween 80 a 0,1% em água destilada e uniformizados através de um macerador de tecidos de vidro de 15 ml (Wheaton, U.S.A.), sendo em seguida coados em gazes.

A contagem dos conídios/ml foi efetuada com um hemocitometro, sendo repetida 2 vezes, segundo a metodologia descrita por BURGESS e THOMSON (1971).

#### 3.3.4. Procedimento experimental

A patogenicidade de *B. bassiana* a larvas de *C.aeneus* foi testada inicialmente com a cepa CP<sub>5</sub> nas dosagens de 1.040, 10.400 e 104.000 conídios viáveis por mm<sup>2</sup> das suspensões de  $1,9 \times 10^7$ ,  $1,9 \times 10^8$  e  $1,9 \times 10^9$  conídios viáveis por ml respectivamente, além de testemunha em laboratório.

Os tratamentos consistiram de 40 larvas do último instar, em 4 repetições, provenientes das vagens de campo.

Grupos de 10 larvas foram pulverizados com 0,3 ml da suspensão de conídios ou 0,3 ml de Tween 80 0,1% para a testemunha, em uma torre calibrada de pulverização direta (Figura 4). Em seguida, cada grupo de larvas foi colocado em placas de Petri contendo 20 g de solo orgânico esterilizado (estufa a 160°C por 4 horas), umedecidos com 10 ml de água destilada esterilizada.

As placas foram mantidas a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As observações foram iniciadas no 7º dia após aplicação de *B. bassiana*, sendo realizadas diariamente, e os insetos mortos eram retirados para confirmação da doença. Estes insetos foram colocados em placas de Petri plásticas (3,4 cm de diâmetro x 1,0 cm de altura) com fundo revestido com papel filtro umedecido com água destilada.

Em etapa posterior foram utilizadas as 5 cepas de *B. bassiana* CP<sub>1</sub>, CP<sub>5</sub>, CP<sub>7</sub>, CP<sub>14</sub> e RS 285, nas dosagens de  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  conídios/ml, representando 549, 5.490 e 54.900 conídios/mm<sup>2</sup> respectivamente, todas apresentando viabilidade de 100%. A metodologia utilizada foi semelhante ao experimento anterior, diferenciando nas observações que foram iniciadas no 2º dia após aplicação dos conídios. Este bioensaio foi repetido 2 vezes.

O bioensaio com adultos, foi semelhante aos conduzidos com larvas, utilizando-se as mesmas cepas e dosagens mencionadas acima, com viabilidade de 100% para todas as cepas. Os tratamentos consistiram de 4 repetições com 10 adul

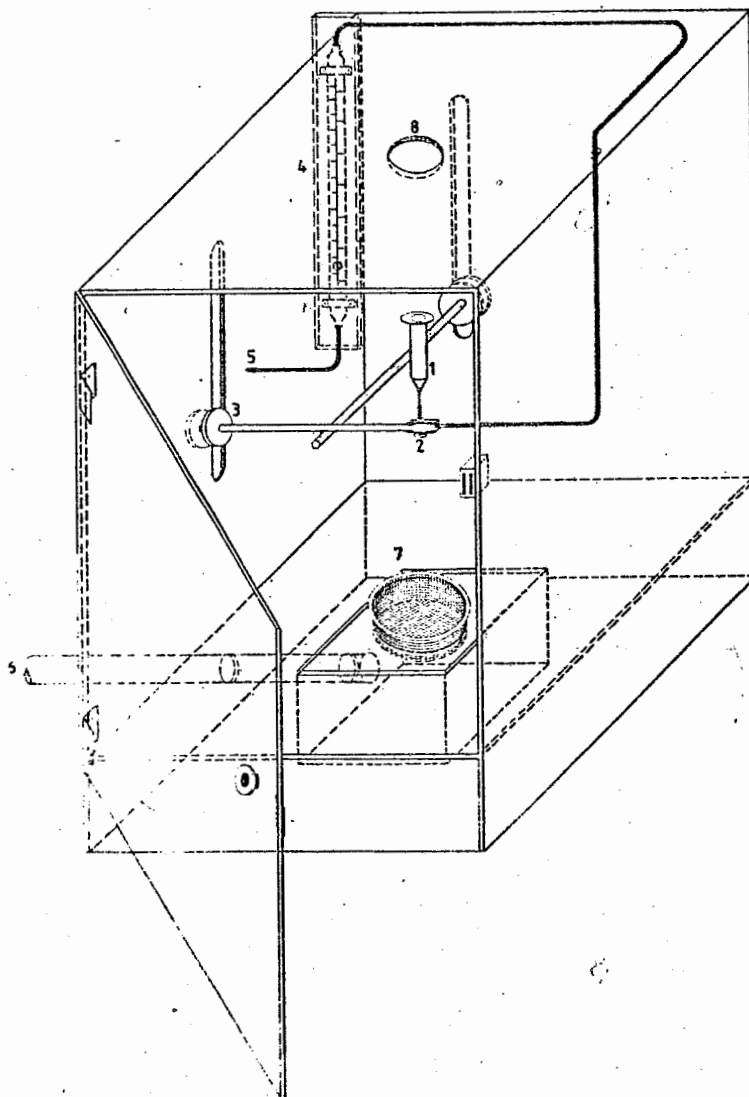


Figura 4. Torre calibrada de pulverização direta. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Legenda:

- 1- Seringa
- 2- Bico de pulverização
- 3- Regulagem da altura de pulverização
- 4- Manômetro
- 5- Tubo de conexão ao compressor
- 6- Tubo de conexão ao aspirador
- 7- Suporte (peneira) para a superfície a ser pulverizada
- 8- Orifício para introdução da pipeta.

tos/repetição. Os adultos, após a pulverização, foram colocados em placas de Petri (10 insetos/placa) com fundo revestido com papel filtro umedecido com água destilada e pedaços de vagens de caupi. As observações foram iniciadas no 4º dia após aplicação dos conídios, sendo realizadas diariamente até o 21º dia e a partir daí aos 24, 28, 31, 34, 37, 43, 48 dias após aplicação dos isolados.

Foram realizadas análises de próbites para calcular o  $TL_{50}$  e o  $TL_{90}$  (tempo letal 50% e 90%) e análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias dos bioensaios. Utilizou também, para comparação dos isolados, a taxa de potência conforme preconizado por ALVES (1986), adotando-se como padrão o isolado  $CP_5$  e a fórmula:

$$TP = \frac{LT_{50} \text{ do isolado padrão}}{LT_{50} \text{ da amostra}} \times 1000$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da temperatura, conteúdo de água no solo e microrganismos na estabilidade de *B. bassiana* em condições controladas.

Os resultados do efeito da temperatura, conteúdo de água e microrganismos na estabilidade de *B. bassiana* em condições controladas encontram-se nas tabelas 4 e 5. A representação gráfica dos dados pode ser vista nas figuras 5, 6, 7 e 8.

Em ambos os solos, autoclavado e não autoclavado, foi nítido o efeito da temperatura e percentagem de saturação de água na sobrevivência de *B. bassiana*. Para níveis constantes de 25% da saturação, observou-se que temperaturas mais baixas mantêm maiores números de colônias do fungo. Observou-se tendência de crescimento do número de colônias, na fase inicial, tendo atingido seu potencial a partir da terceira avaliação aos 24 dias. Na temperatura mais alta ( $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) hou

ve tendência consistente de declínio no número de colônias, sendo que aos 80 dias o número de colônias era significativamente inferior em relação ao início (Figuras 5 e 6). Aos níveis de 75% da saturação observou-se comportamento diferenciado, com tendência de declínio no número de colônias para todas as temperaturas, mesmo mantendo, em ambos os solos, a relação inversa entre número de colônias e temperatura (menos colônias para temperaturas mais altas). A partir da quarta avaliação (38 dias), para o nível mais alto de temperatura, o número de conídios era perceptivelmente inferior quando comparado às outras temperaturas (Figuras 7 e 8). Estas constatações vêm confirmar os resultados de LINGG e DONALDSON (1981), nos quais a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* no solo foi primariamente dependente de temperatura e conteúdo de água e os de MILNER e LUTTON (1976), onde a meia vida dos conídios de *M. anisopliae* no solo foi maior na faixa de 16 a 23°C do que a 30°C.

Ao isolar os efeitos de temperatura observa-se, ainda, que nas temperaturas de  $17 \pm 1$  e  $24 \pm 1$ °C, o número de colônias aumentou até a 3.<sup>a</sup> avaliação (24 dias) para solo autoclavado aos 25% da saturação (Figura 5). Em solo não autoclavado, nas mesmas condições, a sobrevivência de *Beauveria* aos 80 dias era ainda superior para as duas temperaturas, respectivamente, quando comparado ao início do experimento (Tabela 4). Esse aumento pode ser devido a um desenvolvimento do patógeno no solo. Alguns estudos relatam a possibilidade de desenvolvimento de deuteromicetos



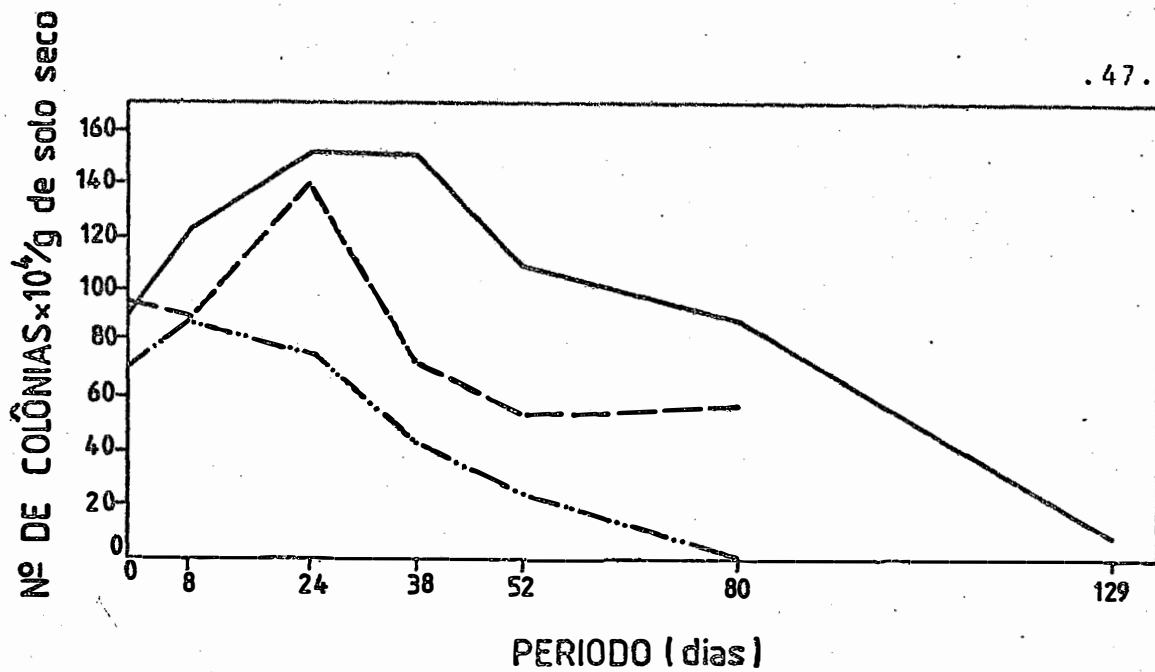


Figura 5. Número de colônias de *B. bassiana* a 17 ± 1°C (—), 24 ± 1°C (---) e 30 ± 1°C (-·-·-) e 25% da saturação de água em solo autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

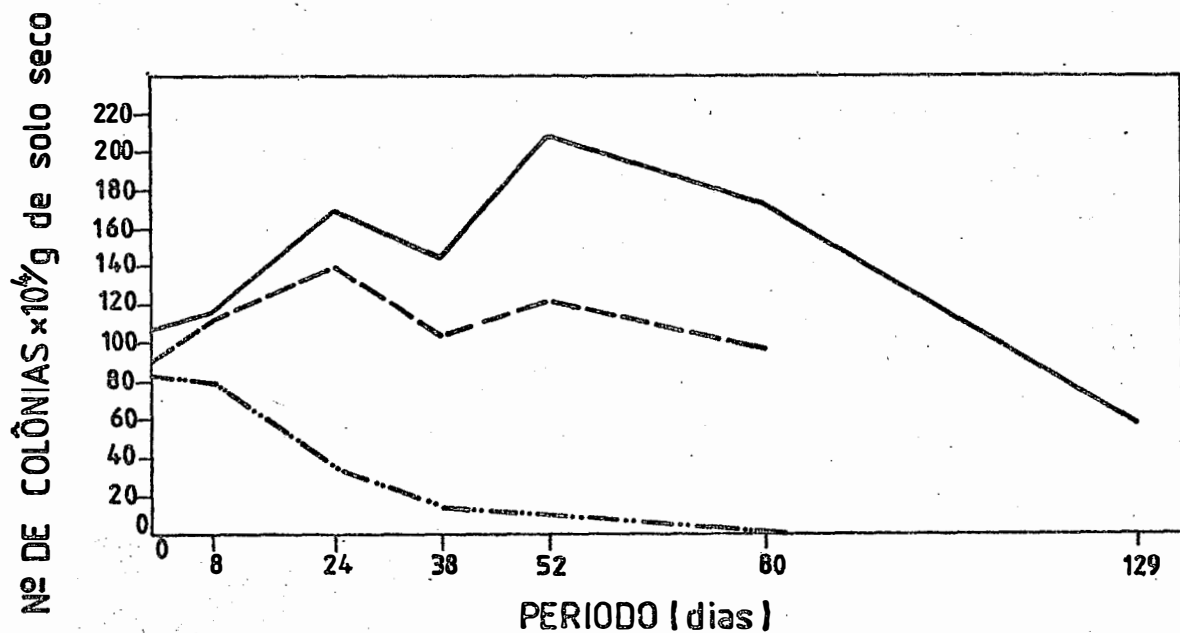


Figura 6. Número de colônias de *B. bassiana* a 17 ± 1°C (—), 24 ± 1°C (---) e 30 ± 1°C (-·-·-) e 25% da saturação de água em solo não autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

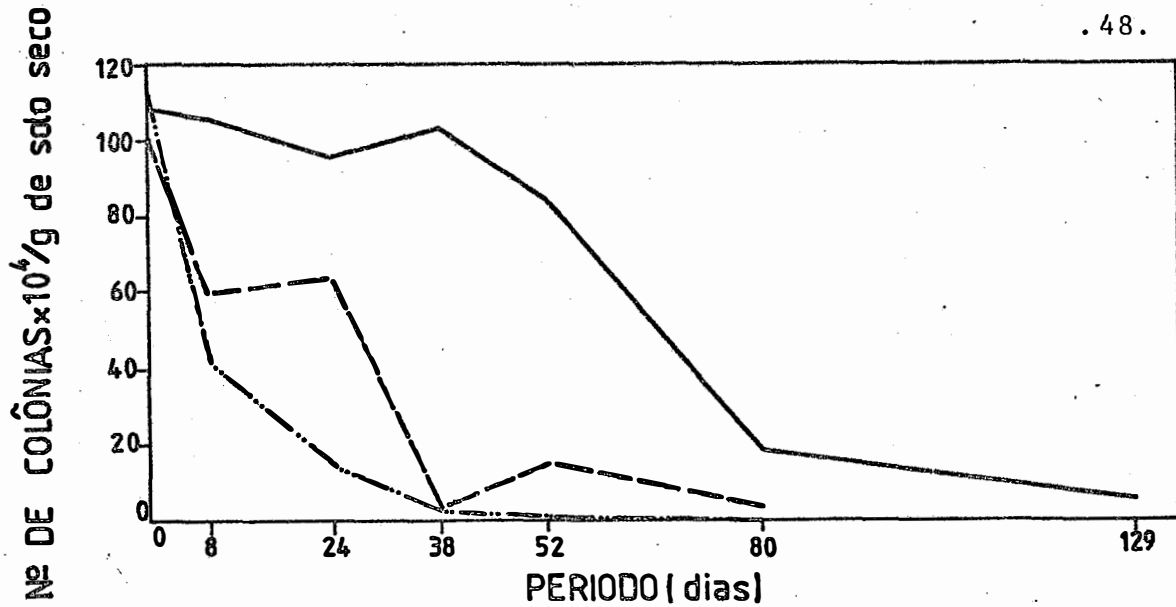


Figura 7. Número de colônias de *B. bassiana* a  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  (—),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  (---),  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (-·-·-) e 75% da saturação em solo autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO, 1986.

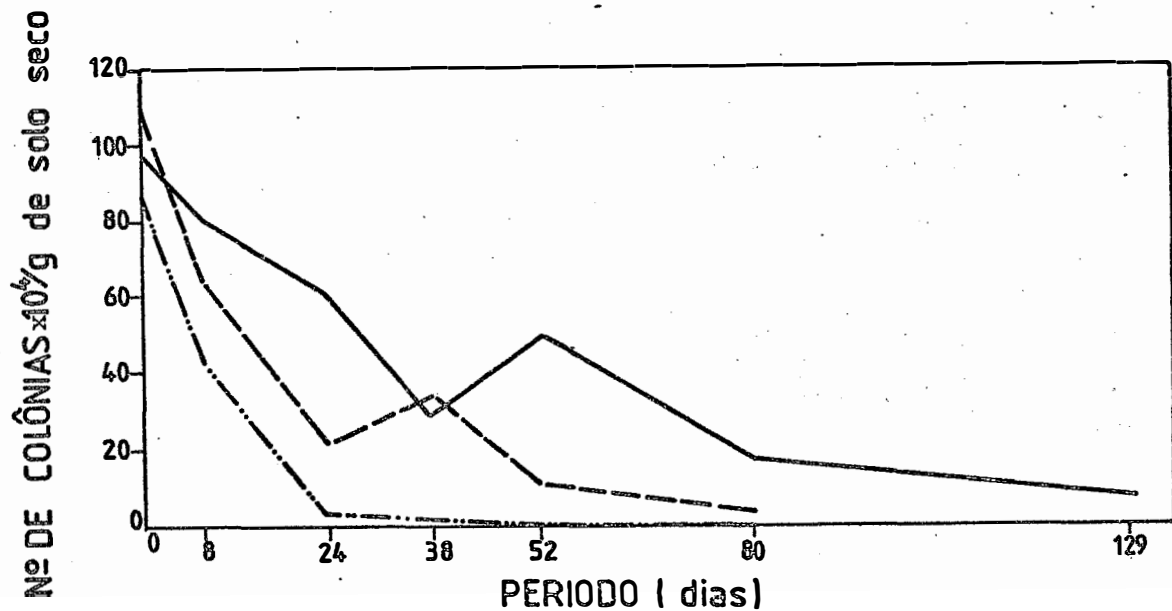


Figura 8. Número de colônias de *B. bassiana* a  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  (—),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  (---),  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (-·-·-) e 75% da saturação em solo não autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO, 1986.

Tabela 4. Número de colônias ( $\times 10^4$ ) de *B. bassiana* (média de 3 repetições), em diferentes temperaturas e percentagens de saturação de água, por grama de solo seco autoclavado e não autoclavado, em vários períodos após infestação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Solo	Dias de Avaliação	Saturação 25%			Saturação 75%		
		17 ± 1°C	24 ± 1°C	30 ± 1°C	17 ± 1°C	24 ± 1°C	30 ± 1°C
Autoclavado	0	90,78	95,11	71,44	109,22	101,22	112,11
	8	123,00	93,11	91,66	106,22	60,33	41,33
	24	152,55	137,00	76,61	96,22	65,44	14,33
	38	151,33	74,00	42,22	104,33	4,00	3,11
	52	110,00	55,44	25,00	84,78	15,67	1,29
	80	88,55	58,00	0,67	18,78	4,14	0,05
	129	10,38	-	-	6,38	-	-
	Média	119,48	85,44	51,27	86,59	41,80	28,70
Não Autoclavado	0	109,11	89,39	83,22	99,11	111,33	87,00
	8	117,33	112,78	80,44	80,78	65,00	41,22
	24	170,67	141,22	34,55	60,67	21,44	4,33
	38	144,67	105,44	14,55	29,00	34,89	1,78
	52	209,22	122,33	10,89	53,00	10,89	0,41
	80	173,44	97,33	0,10	18,55	4,29	0,00
	129	58,17	-	-	5,55	-	-
	Média	158,07	111,36	37,29	56,85	41,31	22,46

em pedaços de planta e no solo (OLIVEIRA, 1979; LINGG e DONALDSON, 1981; FARGUES e ROBERT, 1985; ALVES, 1986). Entretanto, WALSTAD et alii (1970) consideram improvável o crescimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em abundância como saprófita no solo, uma vez que eles são restritos a certos insetos para o seu desenvolvimento. Pode-se observar que ainda existem dúvidas em relação ao desenvolvimento no solo de deuteromicetos patogênicos a insetos. Outros trabalhos devem ser conduzidos para elucidar melhor este fato, como, por exemplo, análises bioquímicas, verificação das estruturas do fungo presentes no solo.

A análise de variância veio confirmar a significância do efeito da temperatura e porcentagem de saturação em todas as avaliações, exceção da primeira, no dia da montagem do experimento, quando não havia diferença entre os tratamentos. Os níveis de significância são altos e crescentes de uma avaliação à seguinte, para temperatura, porcentagem da saturação e a interação temperatura x porcentagem de saturação. O efeito solo (autoclavado e não autoclavado) não foi tão claro, tendo apresentado nível de significância,  $\alpha = 0,01$  depois da 6.<sup>a</sup> avaliação (80 dias), com 5% de significância nas 3.<sup>a</sup> (24 dias) e 5.<sup>a</sup> (52 dias) avaliações (Tabela 5).

Ao associar efeitos de temperatura, porcentagem da saturação, solo e avaliações, numa análise de variância global, observou-se a confirmação desses resultados, com níveis de 1% de significância para temperatura, saturação, ava

Tabela 5. Análise de variância para as avaliações de efeito de temperatura e saturação de água em solo autoclavado e não autoclavado, em condições controladas. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	1ª Avaliação		2ª Avaliação		3ª Avaliação		4ª Avaliação	
		SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F
Temperatura (TEMP)	2	1240,46	1,20	11227,97	7,36**	47818,79	45,94**	51061,05	52,08**
Solo (SO)	1	0,13	0,00	82,00	0,11	2985,41	5,74*	592,11	1,21
Saturação (SAT)	1	1638,00	3,17	12481,85	16,37**	50662,51	97,34**	31525,97	64,31**
TEMP x SO	2	198,35	0,19	1184,33	0,78	461,86	0,44	7995,72	8,15**
TEMP x SAT	2	487,29	0,47	533,52	0,35	3961,10	3,81*	5155,60	5,26**
SO x SAT	1	612,56	1,18	140,03	0,18	1219,17	2,34	459,86	0,94
TEMP x SO x SAT	2	1202,86	1,16	414,68	0,26	3455,62	3,22*	3596,78	3,67*
Valor de F		0,95		3,11**		19,31**		18,62**	
R <sup>2</sup>		30%		59%		90%		90%	
C.V.		23,55		32,70		28,08		37,45	

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade.

Continuação da Tabela 5.

Fontes de Variação	5ª Avaliação			6ª Avaliação			7ª Avaliação		
	Graus de Liberdade	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F
Temperatura (TEMP)	2	67111,71	89,77**	33505,78	89,77**	-	-	-	-
Solo (SO)	1	3243,30	5,50*	3794,63	20,33**	1654,40	56,81**		
Saturação (SAT)	1	33768,14	57,28**	34586,29	185,34**	2403,61	82,53**		
TEMP x SO	2	3162,99	2,68*	2731,20	7,32**	-	-		
TEMP x SAT	2	9132,98	7,75**	19381,77	51,93**	-	-		
SO x SAT	1	8908,21	15,11**	3809,56	20,41**	1772,28	60,85**		
TEMP x SO x SAT	2	7815,29	6,63**	2755,88	7,38**	-	-		
Valor de F		20,53**		48,99**		66,73**			
R <sup>2</sup>		90%		96%		96%			
C.V.		41,65		35,36		26,82			

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade.

liações e todas as suas interações. Apenas o efeito solo não foi significativo, apesar de suas interações simples com temperatura, umidade e avaliações terem-se apresentado com significância de 1% (Tabela 6).

Todas as análises de variância, a partir da 2.<sup>a</sup> avaliação, apresentaram valores significativos de F, com o grau de variação explicado no modelo pelo  $R^2 = 90\%$  a partir de terceira avaliação, e, no modelo geral de todas as avaliações e tratamentos,  $R^2 = 88\%$ . Os coeficientes de variação oscilaram entre avaliações, em níveis não inferiores a 23,55 e não superiores a 41,65 (Tabelas 5 e 6).

Ao avaliar a presença de microrganismos no solo, alguns fatos são evidenciados nos resultados de contagem de colônias de fungos, bactérias e actinomicetos, com possível influência na sobrevivência de *B. bassiana*, a 25% da saturação de água e temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Nestas condições, o número de colônias de *B. bassiana* a partir da 4.<sup>a</sup> avaliação foi estatisticamente superior em solo não autoclavado, em relação ao solo autoclavado (Figura 9), o que não era esperado, uma vez que vários trabalhos têm relatado a influência de microrganismos presentes no solo sobre a persistência de *B. bassiana*. Entretanto, nas avaliações, constatou-se a presença de microrganismos em solo autoclavado, com aumento no decorrer do tempo, e em alguns casos superior ao encontrado em solo não autoclavado.

Tabela 6. Análise de variância para as avaliações de efeito de temperatura e saturação de água em solo autoclavado, não autoclavado, em condições controladas, para sete avaliações. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fontes de Variação	G.L.	SQ	F
Avaliação (AV)	5	82112,89	32,13**
Temperatura (TEMP)	2	172989,97	169,23**
Solo (SO)	1	151,62	0,30
Saturação (SAT)	1	118616,87	232,07**
AV x TEMP	10	38975,80	7,63**
AV x SO	5	10545,96	4,13**
AV x SAT	5	46045,89	18,02**
TEMP x SO	2	4702,46	4,60**
TEMP x SAT	2	22028,60	21,55**
SO x SAT	1	10337,60	20,23**
AV x TEMP x SO	10	11032,00	2,16*
AV x TEMP x SAT	10	16623,66	3,25**
AV x SO x SAT	5	4811,80	1,88
TEMP x SO x SAT	2	11694,60	11,44**
AV x TEMP x SO x SAT	10	7546,52	1,48
Valor de F	15,38**		
R <sup>2</sup>	88%		
C.V.	32,43		

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade.



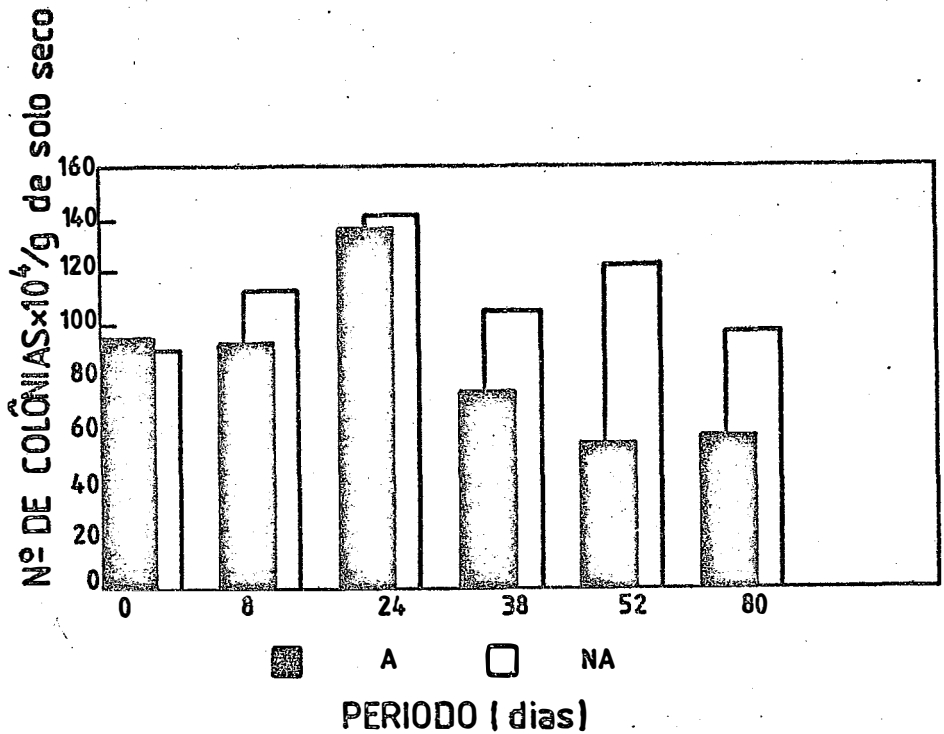


Figura 9. Número de colônias de *B. bassiana* por grama do solo a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e 25% da saturação de água em solo autoclavado (A) e não autoclavado (NA), em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

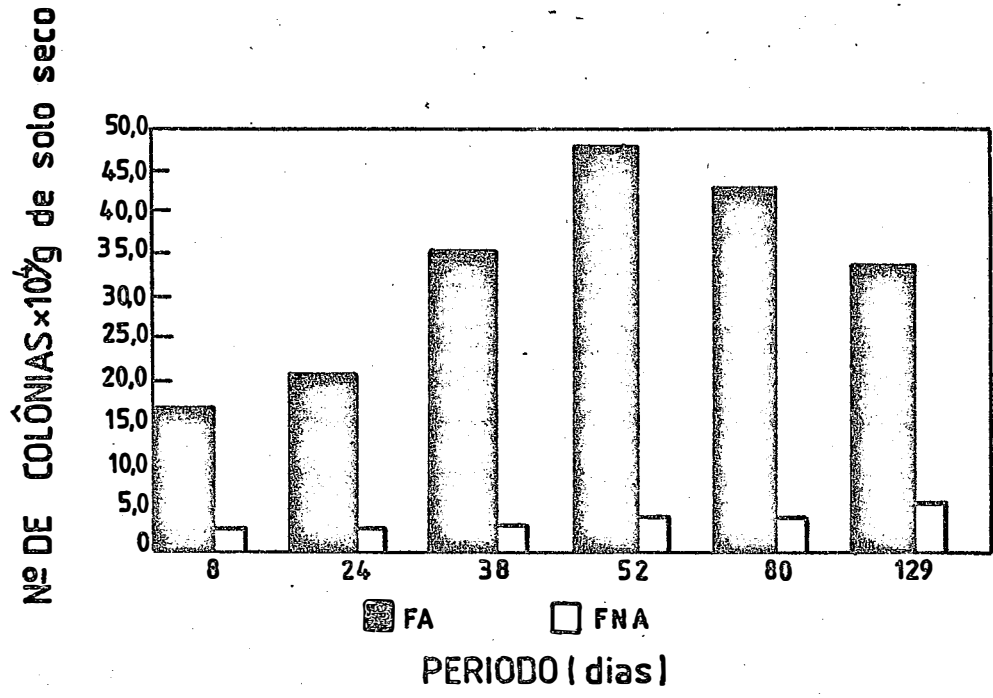


Figura 10. Número de colônias de fungos por grama de solo autoclavado (FA) e não autoclavado (FNA) a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

O número de colônias de outros fungos que não *B. bassiana* em solo autoclavado foi significativamente superior ao solo não autoclavado aos 38, 52, 80 e 129 dias de avaliação (Figura 10). Através da análise de variância, observou-se que o efeito da presença ou não de *B. bassiana* no número de colônias de outros fungos não foi significativa em nenhuma avaliação e na análise de variância global (Tabelas 7 e 8).

A presença de bactérias em ambos os solos não foi bem definida. No 8º dia havia maior número de colônias em solo não autoclavado e no 38º dia o número de colônias era maior em solo autoclavado, sendo que nas outras avaliações não ocorreram diferenças significativas no número de colônias de bactérias nos dois solos (Tabela 7, Figura 11). Entretanto, em solo com inóculo de *B. bassiana* o número de colônias de bactérias foi significativamente inferior aos 24, 38, 52 dias quando comparado com solo não inoculado com *B. bassiana*. Provavelmente, *B. bassiana* tenha um efeito negativo sobre bactérias por estar em grande número no solo nos 52 primeiros dias, e com a sua diminuição no decorrer do tempo este efeito é atenuado (Tabela 7, Figura 12). Na análise de variância global não tiveram efeito solo, *B. bassiana*, avaliações e suas interações (Tabela 8).

Em relação a actinomicetos, o número de colônias foi significativamente superior em solo autoclavado a partir da 3ª avaliação (38º dia), em comparação ao solo não

Tabela 7. Análise de variância para a presença de fungos, bactérias e actinomicetos no solo auto clavado e não autoclavado, na presença ou não de *B. bassiana* em cada avaliação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	1ª Avaliação							
		Fungos				Actinomicetos			
		SQ	F	SQ	F	SQ	F	SQ	F
Solo (SO)	1	485,34	1,17	2320,54	6,11*	17738,14		2,29	
<i>B. bassiana</i> (B.b)	1	792,07	1,91	1,35	0,0	6279,86		0,81	
SO x B.b	1	671,12	1,62	804,22	2,12	26104,20		3,37	
Valor de F		1,56		2,75		2,15			
R <sup>2</sup>		44%		57,8%		51,8%			
C.V.		208,61		83,61		82,17			
2ª Avaliação									
Solo (SO)	1	804,01	4,80	9,34	0,44	1,88		0,01	
<i>B. bassiana</i> (B.b)	1	210,31	1,26	170,01	7,94	2769,87		11,9**	
SO x B.b	1	142,09	0,85	1050,02	49,03**	1437,33		6,17*	
Valor de F		2,30		19,13**		6,03*			
R <sup>2</sup>		53,51%		90,53%		75,08%			
C.V.		108,14		35,51		62,62			

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade.

Continuação da Tabela 7.

Vontes de Variação	Graus de Liberdade	3ª Avaliação					
		Fungos		Bactérias		Actinomicetos	
		SQ	F	SQ	F	SQ	F
Solo (SO)	1	2613,61	15,01**	126,50	11,75**	6536,54	9,19*
<i>B. bassiana</i> (B.b)	1	1,25	0,01	426,49	39,61**	3562,53	5,01
SO x B.b	1	1,67	0,01	560,39	52,05**	6482,67	9,11*
Valor de F		5,01*		34,47**		7,77**	
R <sup>2</sup>		71,47%		94,51%		79,53%	
C.V.		68,60		30,44		46,54	
4ª Avaliação							
Solo (SO)	1	4766,94	8,11*	2,92	0,05	402537,34	13,71**
<i>B. bassiana</i> (B.b)	1	74,07	0,13	1128,4	19,01**	343173,65	11,69**
SO x B.b	1	89,63	0,15	300,16	5,06	322031,42	10,97**
Valor do F		2,79		8,04**		12,12**	
R <sup>2</sup>		58,28%		80,08%		86,84%	
C.V.		93,87		56,07		71,58	

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade.

Continuação da Tabela 7.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	5ª Avaliação					
		Fungos		Bactérias		Actinomicetos	
		SQ	F	SQ	F	SQ	F
Solo (SO)	1	3815,51	9,10*	32,95	1,35	65151,80	81,31**
<i>B. bassiana</i> (B.b)	1	6,45	0,02	10,22	0,42	10675,56	13,32**
SO x B.b	1	5,20	0,01	6,03	0,25	10287,87	12,84**
Valor de F		3,04		0,67		35,83**	
R <sup>2</sup>		60,34%		26,19		94,71%	
C.V.		86,66		105,85		25,93	
6ª Avaliação							
Solo (SO)	1	1982,46	10,92**	608,40	0,38	122544,90	34,52**
<i>B. bassiana</i> (B.b)	1	55,55	0,31	1713,78	1,07	35542,89	10,01**
SO x B.b	1	10,36	0,06	707,27	0,44	28210,02	7,95*
Valor do F		3,76		0,63		17,49**	
R <sup>2</sup>		65,27%		23,89%		89,74	
C.V.		68,34		183,42		44,27	

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade.

Tabela 8. Análise de variância para a presença de fungos, bactérias e actinomicetos no solo autoclavado e não autoclavado, na presença ou não de *B. bassiana*. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Fungos		Bactérias		Actinomicetos	
		SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F
Solo (SO)	1	12774,03	39,39**	62,40	0,18	234458,34	33,17**
<i>B. bassiana</i> (B.b.)	1	375,36	1,16	152,44	0,43	190539,68	26,96**
Avaliação (AV)	5	2006,40	1,24	2450,62	1,40	274345,35	7,76**
SO x B.b	1	378,36	1,17	881,12	2,51	207896,35	29,41**
SO x AV	5	1693,85	1,04	3038,26	1,73	380052,26	10,75**
B.b x AV	5	764,34	0,47	3297,82	1,88	211464,67	5,98**
SO x B.b x AV	5	541,71	0,33	2546,97	1,45	186657,17	5,28**
Valor de F			2,49		1,54		10,37**
R <sup>2</sup>			61,3%		49,6%		86,88%
C.V.			98,12		128,59		75,07

\* Significante ao nível de 95% de probabilidade.

\*\*Significante ao nível de 99% de probabilidade.

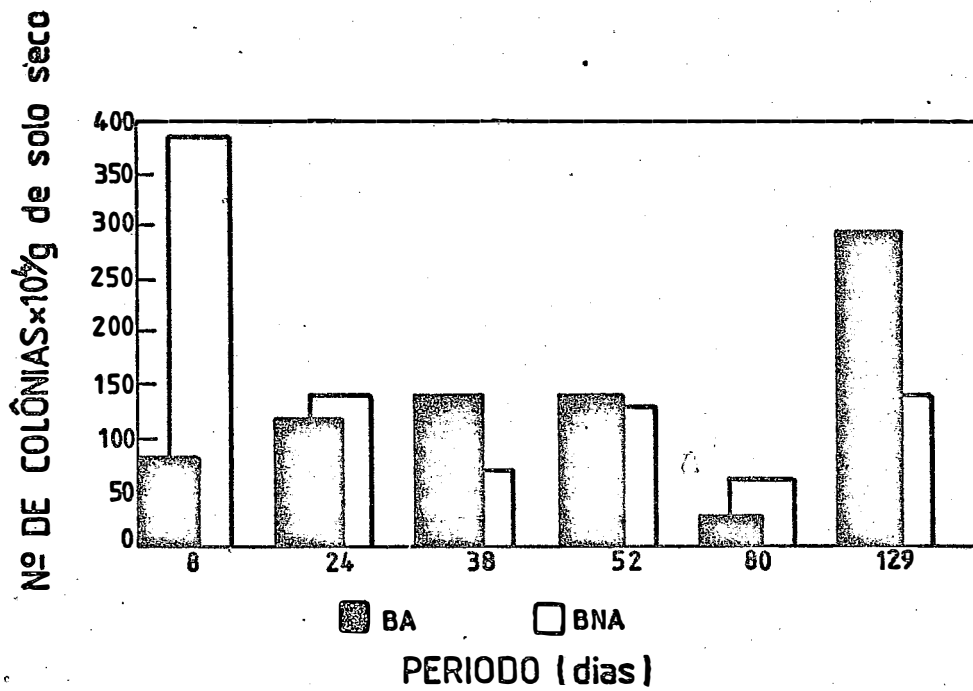


Figura 11. Número de colônias de bactérias por grama de solo auto clavado (BA) e não autoclavado (BNA) a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

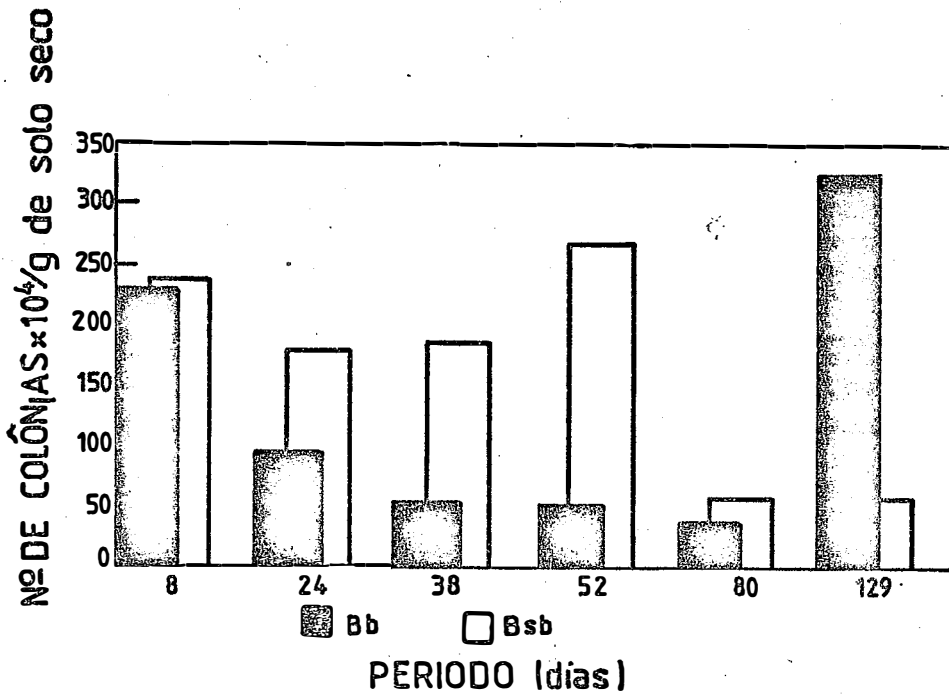


Figura 12. Número de colônias de bactérias por grama de solo com (Bb) e sem *B. bassiana* (Bsb) a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

autoclavado (Tabela 7, Figura 13). No solo sem inóculo de *B. bassiana* o número de colônias também foi significativamente maior a partir da 2.<sup>a</sup> avaliação (24 dias), em relação ao solo com inóculo (Tabela 7, Figura 14). Estes resultados demonstram que *B. bassiana* possivelmente exerce efeito sobre estes actinomicetos. Conforme o número de colônias de *B. bassiana* decrescia, o número de actinomicetos aumentava. Em relação a interação solo e *Beauveria*, solo autoclavado sem *B. bassiana* foi superior, da 2.<sup>a</sup> a 6.<sup>a</sup> avaliações, ao solo não autoclavado sem *B. bassiana*. Solo não autoclavado foi semelhante com e sem inóculo de *B. bassiana*. Na análise de variância global, solo, *B. bassiana*, avaliações, solo x *B. bassiana*, solo x avaliações, *B. bassiana* x avaliações, solo x *B. bassiana* x avaliações foram todas significativas ao nível de 1% (Tabela 8).

Pelos resultados observa-se que o número de outros fungos que não *B. bassiana* e actinomicetos foi maior e crescente no tempo em solo autoclavado, provavelmente devido à falta de competição neste solo, pois na autoclavagem foram eliminados todos os microrganismos e, aqueles que contaminaram o solo posteriormente, não tiveram competidores e puderam desenvolver-se livremente. Em solo não autoclavado o número de colônias de outros fungos e actinomicetos não oscilou (Figuras 10 e 13) possivelmente devido a um equilíbrio entre os microrganismos no solo.



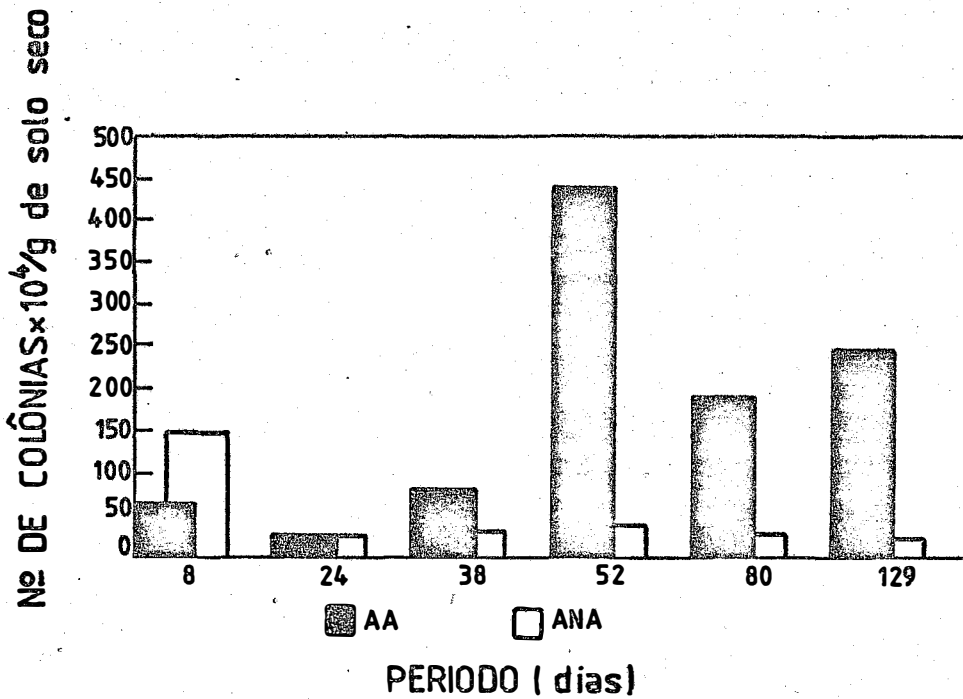


Figura 13. Número de colônias de actinomicetos por grama de solo autoclavado (AA) e não autoclavado (ANA) a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

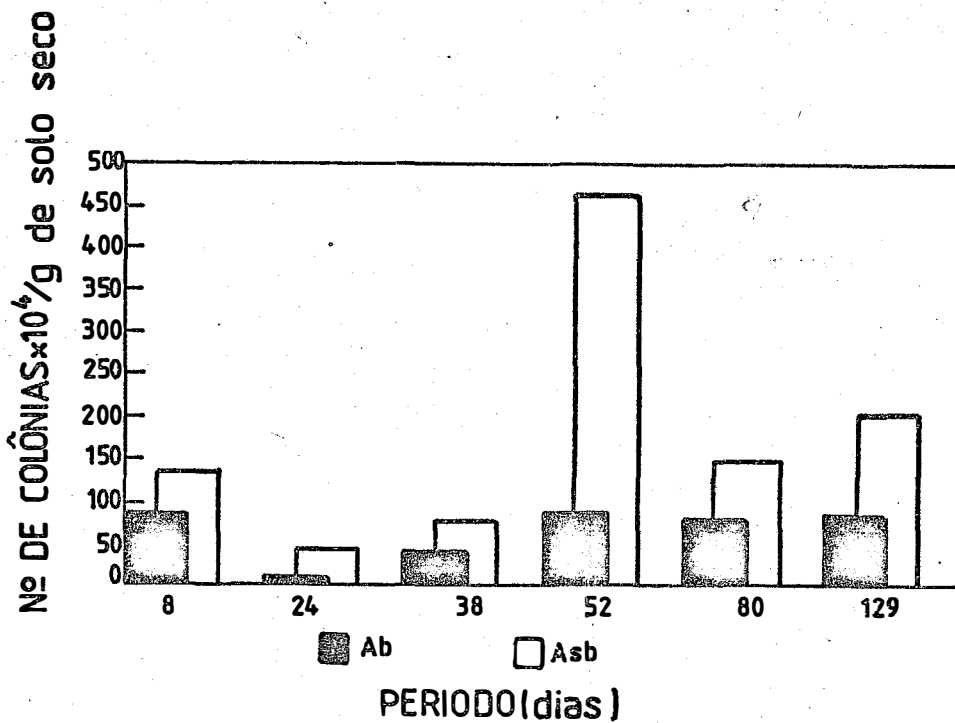


Figura 14. Número de colônias de actinomicetos por grama de solo com (Ab) e sem (Asb) *B. bassiana* a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

LINGG e DONALDSON (1981) relataram que em muitos casos a sobrevivência de *B. bassiana* foi maior em solo não autoclavado em comparação ao solo autoclavado, embora este efeito fosse dissipado nas temperaturas e níveis de saturação mais altas. Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo: na temperatura de  $17 \pm 1$  e  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e percentagem de saturação de 25 em solo não autoclavado, a sobrevivência de *B. bassiana* foi maior em relação ao solo autoclavado, enquanto que nas temperaturas de  $17 \pm 1$ ,  $24 \pm 1$ ,  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 75% da saturação e  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  a 25% da saturação a sobrevivência foi maior em solo autoclavado. LINGG e DONALDSON (1981) mencionam, ainda, que o efeito adverso na sobrevivência de conídios, particularmente a baixas temperaturas e 25% da saturação, talvez ocorra devido a produtos tóxicos produzidos durante a esterilização do solo. Por outro lado, análises químicas de amostras de solo autoclavado e não autoclavado demonstraram que não existe muita diferença entre os componentes inorgânicos do solo (Tabela 1).

Neste estudo verificou-se que solo autoclavado, quando manipulado, dificilmente ficará isento de contaminantes. Outros autores, conduzindo trabalhos com solos esterilizados, não tem dado atenção a avaliação dos microrganismos, que podem estar presentes, e algumas vezes em número superior aos existentes nos solos não autoclavados.

Vários autores tem relatado o efeito prejudi

cial de bactérias (REISINGER et alii 1977; OLIVEIRA, 1979; FARGUES et alii, 1983; CLERK, 1969; ROBERTS e CAMPBELL, 1977) actinomicetos (CLERK, 1969; ROBERTS e CAMPBELL, 1977) e fungos (LINGG e DONALDSON, 1981) em *B. bassiana* no solo. Observou-se, neste trabalho, que na temperatura de  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 25% da saturação, a sobrevivência de *Beauveria* foi maior em solo não autoclavado, onde o número de fungos e actinomicetos foi menor. Por outro lado, em solo sem inóculo de *B. bassiana* bactérias e actinomicetos estavam em maior número, em relação ao solo com *B. bassiana*. Este fato pode ser explicado pela propriedade antibiótica que *B. bassiana* possui contra saprófitas do solo a qual foi demonstrada no trabalho de WALSTAD et alii (1970).

#### 4.2. Estabilidade de *B. bassiana* em condições de campo

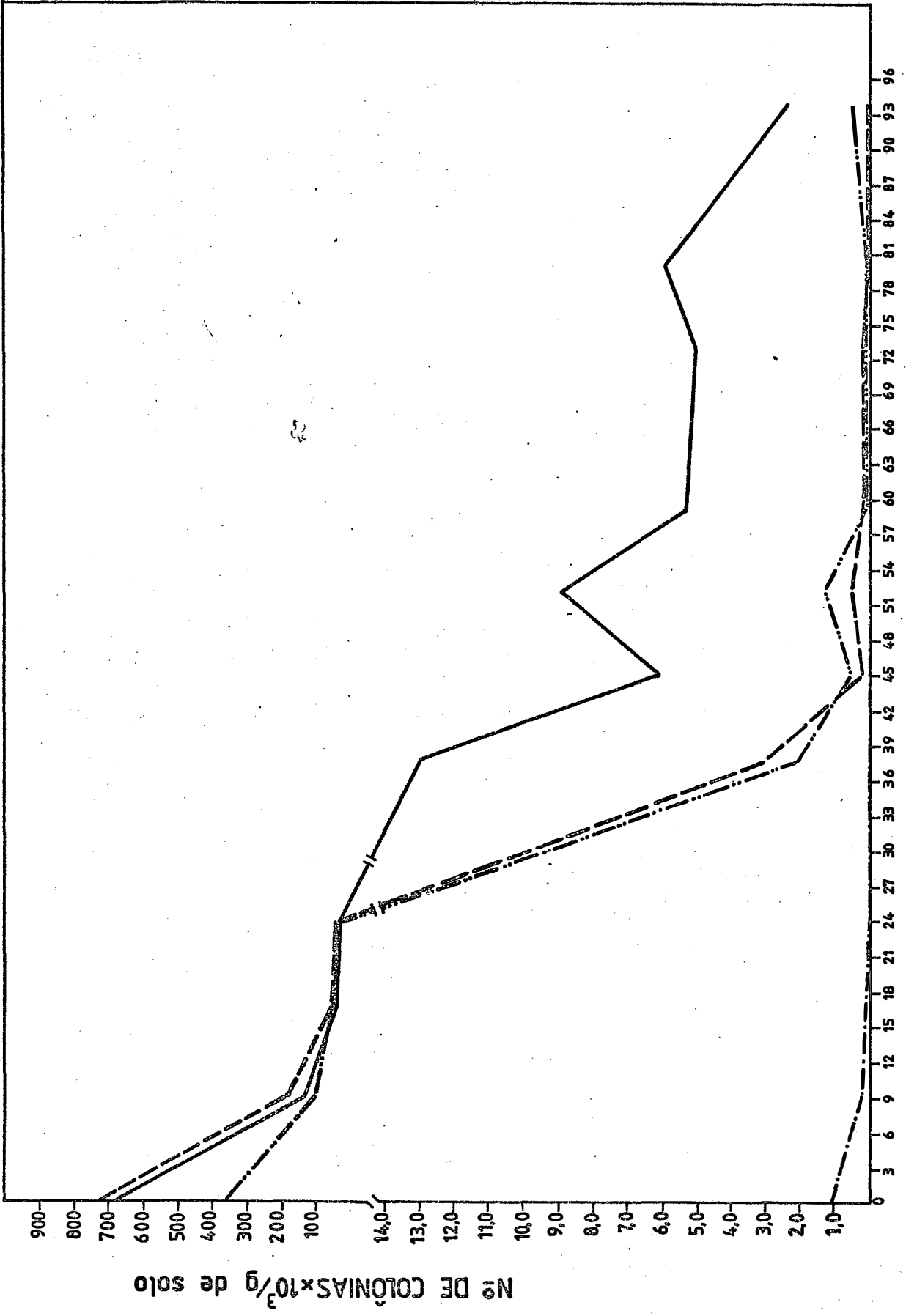
Na avaliação da eficiência de um inseticida biológico, é necessário determinar o tempo de sobrevivência do agente no ambiente no qual será introduzido (LATCH e FALLON, 1976).

Nos tratamentos testados, a sobrevivência de *B. bassiana*, quando aplicaram-se conídios na superfície do solo com plantas e na superfície do solo ou misturado ao solo sem plantas, não apresentaram diferenças significativas até a 4.<sup>a</sup> avaliação (24 dias), embora o número de colônias por grama de solo tenha decrescido drasticamente em todos os tra

tamentos na fase inicial (Figura 15). A partir da 5.<sup>a</sup> avaliação (38 dias), o número de colônias de *Beauveria* em solo com planta foi superior aos tratamentos em que o fungo foi aplicado na superfície ou misturado ao solo desnudo, estes em níveis semelhantes ao da testemunha. Aos 94 dias o número médio de colônias de *B. bassiana* por grama de solo era de 2470 para solo com planta, 130 para a aplicação na superfície e 550 para conídios misturados ao solo (Figura 15).

A análise de variância comprova esses resultados demonstrando que, para as avaliações de campo, com e sem plantas de caupi, com aplicação de *B. bassiana* na superfície ou misturado ao solo, não houve efeito significativo de blocos nas 11 avaliações, enquanto que para tratamentos, os níveis de significância estatística foram superiores a 99%, confirmando que há diferença nítida entre os tratamentos testados em todas as avaliações. O efeito cobertura foi evidenciado a partir da 5.<sup>a</sup> avaliação (38 dias), com 99% de significância. O tipo de aplicação de *B. bassiana*, na superfície ou misturado ao solo não foi significativo nas 11 (onze) avaliações, indicando que o modo de aplicação não interferiu na sobrevivência do fungo no solo. A grande disparidade entre níveis de colônias, em avaliações sucessivas e entre tratamentos se expressa em altos coeficientes de variação (Tabela 9).

Analisando os efeitos de temperatura em solo



PERÍODO (dias)

Figura 15. Número de colônias de *B. bassiana* por grama de solo, aplicado na superfície em solo com plan- ta (—), aplicado na superfície em solo desnudo (---) misturado ao solo desnudo (-.-.-) e sem aplicação (-.-). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Tabela 9. Análise de variância para as avaliações de campo, com e sem plantas de Caupi (cobertura), com e sem aplicação de *B. bassiana* na superfície e misturado ao solo (Aplicação). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fontes de Variação	G.L.	1ª Avaliação		2ª Avaliação		3ª Avaliação		4ª Avaliação	
		SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F
Bloco	5	1244,37	0,29	172,56	0,99	52,49	1,92	14,46	1,00
Tratamento	3	20809,32	8,21**	1129,60	10,84**	110,47	6,74**	56,22	6,45**
Contrastes									
<i>B. bassiana</i>	1	16056,32	18,99**	928,27	26,73**	102,48	18,75**	53,69	18,49**
Cobertura	1	4646,48	5,50*	68,53	1,97	2,39	0,44	0,90	0,31
Aplicação	1	499,28	0,59	0,14	0,00	6,81	1,25	10,89	3,75
Valor de F		3,26*		4,69		3,73**		3,04	
R <sup>2</sup>		63%		71%		66%		62%	
C.V.		64,75		54,57		65,12		65,68	

\* Significante ao nível de 95% de probabilidade

\*\* Significante ao nível de 99% de probabilidade.

Continuação da Tabela 9.

Fontes de Variação	G.L.	5ª Avaliação		6ª Avaliação		7ª Avaliação		8ª Avaliação	
		SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F
Bloco	5	1,35	1,58	0,26	1,06	0,37	1,22	0,17	1,02
Tratamento	3	6,13	11,96**	1,55	10,60**	3,08	16,85**	1,25	12,13**
Contrastes									
B. <i>bassiliana</i>	1	1,66	9,74**	0,24	4,90*	0,67	11,05**	0,16	4,80*
Cobertura	1	5,83	34,13**	1,54	31,59**	3,01	49,42**	1,25	36,36**
Aplicação	1	0,50	2,94	0,11	2,19	0,17	2,88	0,13	3,83
Valor de F		5,47**		4,64**		7,08**		5,18**	
R <sup>2</sup>		74%		71%		79%		73%	
C.V.		90,25		127,05		84,86		128,90	

\* Significante ao nível de 95% de probabilidade

\*\* Significante ao nível de 99% de probabilidade.

Continuação da Tabela 9.

Fontes de Variação	G.L.	9ª Avaliação		10ª Avaliação		11ª Avaliação	
		SQ	Valor do F	SQ	Valor do F	SQ	Valor do F
Bloco	5	0,29	1,25	0,16	0,89	0,07	1,16
Tratamento	3	1,08	7,78**	1,63	15,16**	0,23	6,78**
Contrastes							
B. <i>basiliana</i>	1	0,16	3,46	0,19	5,47*	0,05	4,23*
Cobertura	1	1,08	23,26**	1,63	45,47**	0,22	19,50**
Aplicação	1	0,12	2,58	0,17	4,70*	0,00	0,39
Valor de F		3,70**		6,24**		3,27*	
R <sup>2</sup>		66%		77%		63%	
C.V.		151,44		120,72		135,53	

\* Significante ao nível de 95% de probabilidade

\*\* Significante ao nível de 99% de probabilidade.



gramado e desnudo, à profundidade de 5 cm, pode-se observar, na Figura 16, que em solo desnudo a temperatura máxima foi sempre superior, muitas vezes excessivamente mais alta que as máximas do solo gramado. As temperaturas mínimas nesse solo sem cobertura apresentou-se em geral inferior àquelas em solo coberto. Observa-se também muito maior variação entre máximas e mínimas sob solo descoberto, enquanto as diferenças desses níveis sob cobertura foi bem menor. A temperatura pode ter sido um importante fator influenciando a permanência de *B. bassiana* em condições de campo. Embora obtidos em solo gramado, os resultados constituem valiosa aproximação da temperatura do solo com planta. Os resultados obtidos em laboratório a diferentes temperaturas e percentagens de saturação de água no solo comprovaram que altas temperaturas são prejudiciais aos conídios. A temperatura máxima em solo desnudo foi na maior parte do tempo superior a 32°C e algumas vezes próxima a 40°C. Em solo gramado, a máxima não ultrapassou 27°C e a temperatura mínima não excedeu a 21°C.

Além da temperatura, a radiação solar pode ter sido um dos fatores que afetaram a permanência de conídios aplicados na superfície ou misturados ao solo. Em solo com plantas, este efeito pode ter sido atenuado pela cobertura das plantas. A radiação solar acumulada no período de realização do experimento está expressa através da Figura 17.

A avaliação do número de colônias de microrganismos em solo com e sem plantas de caupi não foi significativa.

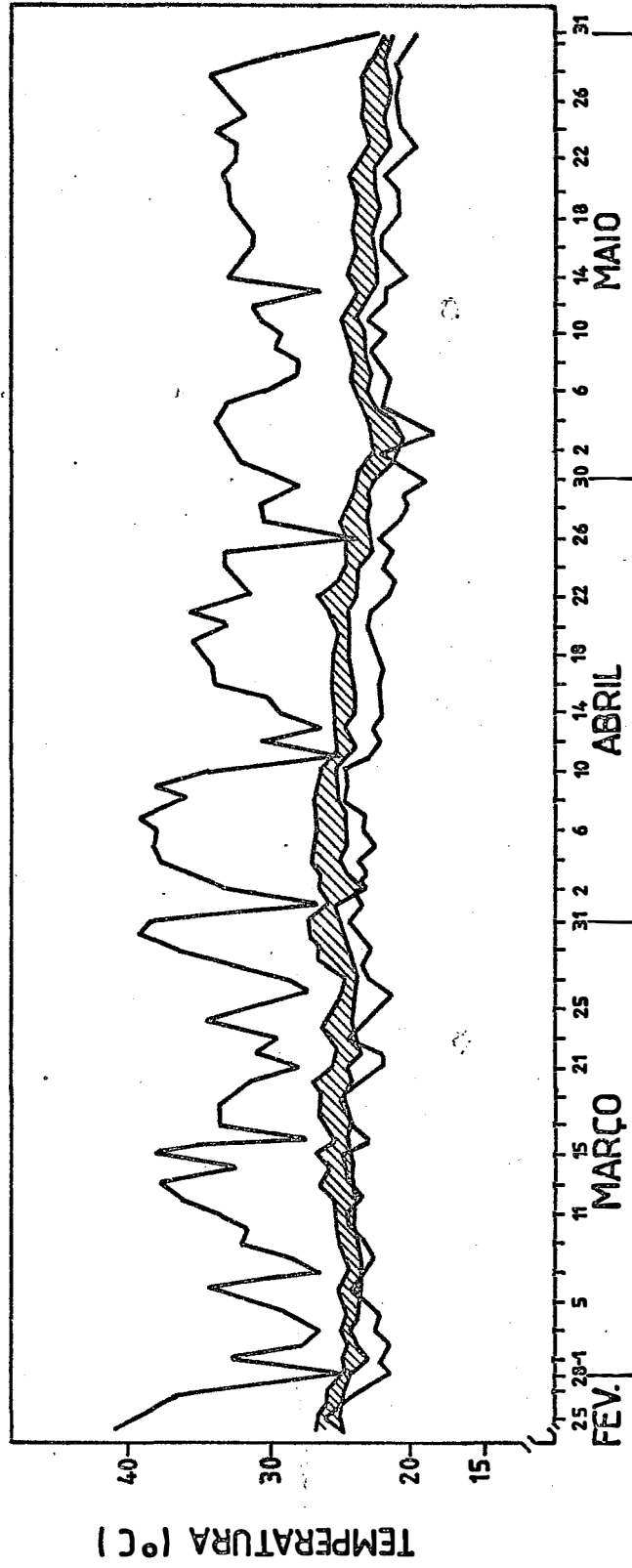


Figura 16. Temperatura máxima e mínima em solo desnudo (área em branco) e gramado (área tracejada) no período de 25 de fevereiro a 31 de maio. CNPAF, Goiânia, GO. 1986

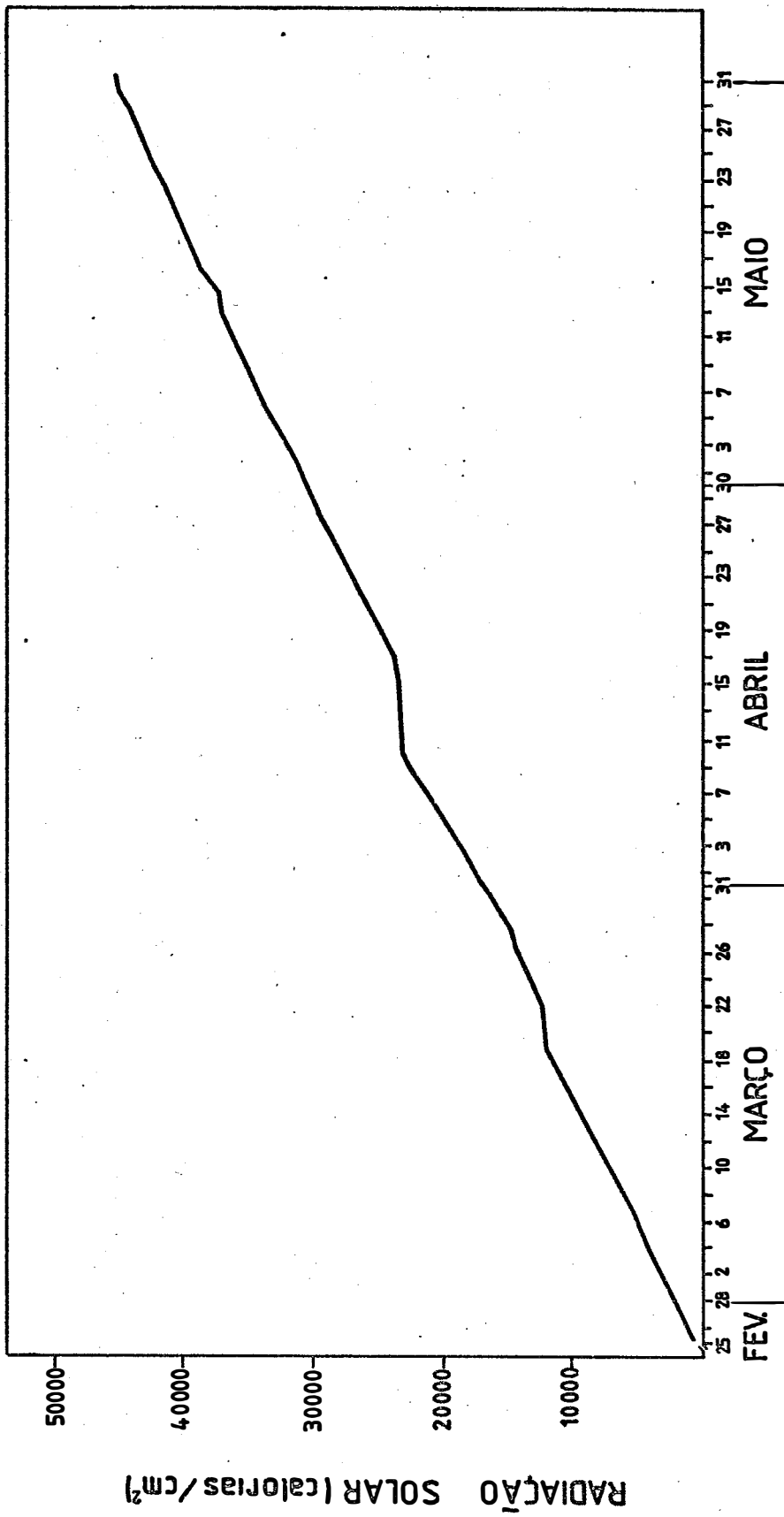


Figura 17. Radiação solar acumulada em calorias/cm<sup>2</sup> no período de 25 de fevereiro a 31 de maio. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

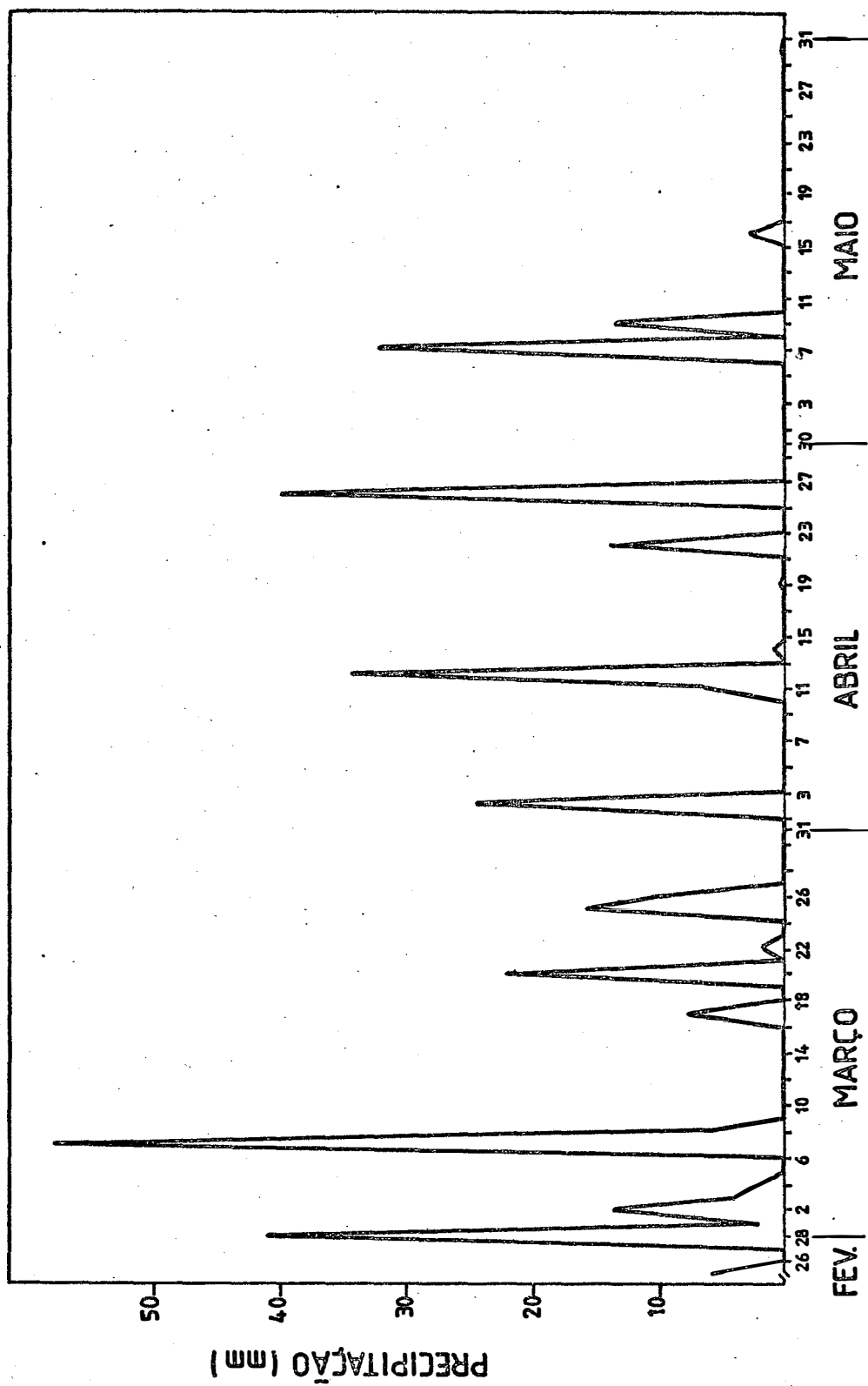


Figura 18. Precipitação pluviométrica em milímetro no período de 25 de fevereiro a 31 de maio. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

tiva para bactérias fungos e actinomicetos (Tabela 10).

#### 4.3. Patogenicidade de *B. bassiana* a larvas e adultos do manhoso, *Chalcodermus aeneus* Boheman

O primeiro teste de patogenicidade, utilizando *B. bassiana* CP<sub>5</sub> (isolada de *C. arcuata*), em três dosagens resultou em baixos índices de mortalidade acumulada para a menor dosagem ( $1,9 \times 10^7$  conídios/ml), com 12 larvas mortas por *B. bassiana* num total de 39 larvas iniciais. A maior dosagem ( $1,9 \times 10^9$  conídios/ml) provocou mortalidade de 100% e foi significativamente superior às duas outras doses testadas. Para a testemunha não foi observada mortalidade pelo fungo. Na dosagem mais alta de *B. bassiana* seriam necessários 5 dias para matar 50% dos insetos (LT<sub>50</sub>) e 7,5 dias para matar 90% dos insetos (LT<sub>90</sub>) (Tabela 11).

A segunda etapa de testes de patogenicidade foi realizada em dois bioensaios sucessivos comparando a eficiência de cinco cepas de *B. bassiana*, em três diferentes dosagens. O número de larvas mortas não foi significativamente diferente para as diferentes cepas, pelo teste de Tukey. Para o número de larvas mortas, por infecção confirmada de *B. bassiana*, a cepa CP<sub>1</sub> (isolada de Vespidae) demonstrou ser a mais eficiente, na dosagem de  $10^9$  conídios/ml. A cepa CP<sub>14</sub> (isolada de *C. aeneus*), com  $10^8$  conídios/ml, apresentou o pior desempenho em termos do número de larvas mortas com

Tabela 10. Número de colônias  $\times 10^4$  de bactérias, fungos e actinomicetos por grama de solo com e sem plantas de caupi (Média de 3 repetições). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Solo	Número de Colônias <sup>1</sup>		
	Fungos	Bactérias	Actinomicetos
Sem Plantas	18,33 a	111,11 a	19,78 a
Com Plantas	17,67 a	178,89 a	20,55 a

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey.

Tabela 11. Mortalidade acumulada de larvas de *C. aeneus*, pulverizadas com *B. bassiana*, número de larvas com infecção confirmada e tempo letal (LT) 50 e 90%, após 12 dias da inoculação. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Dosagens	Número Inicial de Larvas	Mortalidade Acumulada <sup>1</sup>			Infecções Confirmadas <sup>1</sup> (dias)	LT <sub>50</sub> (dias)	LT <sub>90</sub> (dias)
		Dias após Inoculação	7	9			
1,9 x 10 <sup>7</sup> Conídios/ml	39	5	6	12 c	12 c	-	-
1,9 x 10 <sup>8</sup> Conídios/ml	40	21	28	34 b	34 b	7,2	-
1,9 x 10 <sup>9</sup> Conídios/ml	40	35	39	40 a	40 a	4,9	7,5
Testemunha	40	1	1	1 d	0 d	-	-

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey.

infecção confirmada, não diferindo do tratamento testemunha. (Tabela 12).

A análise de próbites para estimar o tempo letal, resultou, nesse primeiro teste dos cinco isolados, em períodos mais curtos para matar metade ( $LT_{50}$ ) e noventa por cento da população ( $LT_{90}$ ) para as concentrações mais altas. As cepas  $CP_1$ ,  $CP_7$  e  $CP_5$  apresentaram os melhores desempenhos, com 4,4 a 5,3 dias respectivamente para tempo letal 50, à dosagem de  $10^7$  conídios/ml, e 8,3 a 9,6 dias para o tempo letal 90, comparados aos 12,2 dias para o tempo letal 90 de  $CP_{14}$  na mesma dosagem (Figura 19). Para a dosagem de  $10^8$  conídios/ml,  $CP_7$  apresentou melhor eficiência, com  $LT_{50} = 3,3$  e  $LT_{90} = 5,4$  dias, comparados aos 6,4 e 12,1 dias de  $LT_{50}$  e  $LT_{90}$ , respectivamente para a cepa  $CP_{14}$  nessa dosagem. Para  $CP_1$  e  $CP_5$  o tempo letal 50 ficou em 3,9 e 4,2, enquanto o tempo letal 90 foi de 5,9 a 5,7 dias, respectivamente, a  $10^8$  conídios/ml (Figura 20). Também na maior dosagem ( $10^9$  conídios/ml), o isolado  $CP_7$  apresentou a melhor eficiência, com  $LT_{50}$  de 2,6 dias e  $LT_{90}$  de 3,8 dias. O pior desempenho ficou para  $CP_{14}$  com 8 dias de  $LT_{90}$  e 5,9 dias de  $LT_{50}$  (Figura 21).

Em relação a taxa de potência,  $CP_1$  e  $CP_7$  foram as que mais se destacaram na dosagem de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml, entretanto na dosagem de  $10^9$  conídios/ml,  $CP_7$  e RS 285 foram mais potentes (Tabela 12).

Essa avaliação das cinco cepas, em três dosa



Tabela 12. Mortalidade acumulada de larvas de *C. aeneus*, pulverizadas com três dosagens de diferentes isolados de *B. bassiana*, número de larvas com infecção confirmada e taxa de potência. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Número do Isolado	Número Inicial de Larvas	Dosagens (Conídios/mL)	Mortalidade Acumulada <sup>1</sup>			Número de Larvas com Infecção Confirmada <sup>1</sup>	Taxa de Potência (UP)
			3	8	12		
CP <sub>1</sub>	39	10 <sup>7</sup>	15	35	36 a	18 bc	1204
CP <sub>5</sub> <sup>2</sup>	32	10 <sup>7</sup>	4	30	31 a	24 abc	1000
CP <sub>7</sub>	39	10 <sup>7</sup>	20	39	39 a	35 ab	1204
CP <sub>14</sub>	38	10 <sup>7</sup>	16	26	33 a	18 bc	946
RS 285	34	10 <sup>7</sup>	5	28	29 a	20 bc	981
CP <sub>1</sub>	39	10 <sup>8</sup>	13	39	39 a	29 abc	1076
CP <sub>5</sub>	35	10 <sup>8</sup>	6	35	35 a	24 abc	1000
CP <sub>7</sub>	38	10 <sup>8</sup>	18	32	37 a	28 abc	1272
CP <sub>14</sub>	36	10 <sup>8</sup>	11	22	32 a	16 cd	656
RS 285	32	10 <sup>8</sup>	7	32	32 a	21 bc	1000
CP <sub>1</sub>	41	10 <sup>9</sup>	17	41	41 a	39 a	1151
CP <sub>5</sub>	40	10 <sup>9</sup>	9	40	40 a	30 abc	1000
CP <sub>7</sub>	39	10 <sup>9</sup>	24	39	39 a	33 abc	1461
CP <sub>14</sub>	38	10 <sup>9</sup>	1	36	38 a	22 abc	644
RS 285	38	10 <sup>9</sup>	26	38	38 a	24 abc	1461
Testemunha	33	-	0	7	11 b	0 d	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey.

<sup>2</sup> Isolado padrão.

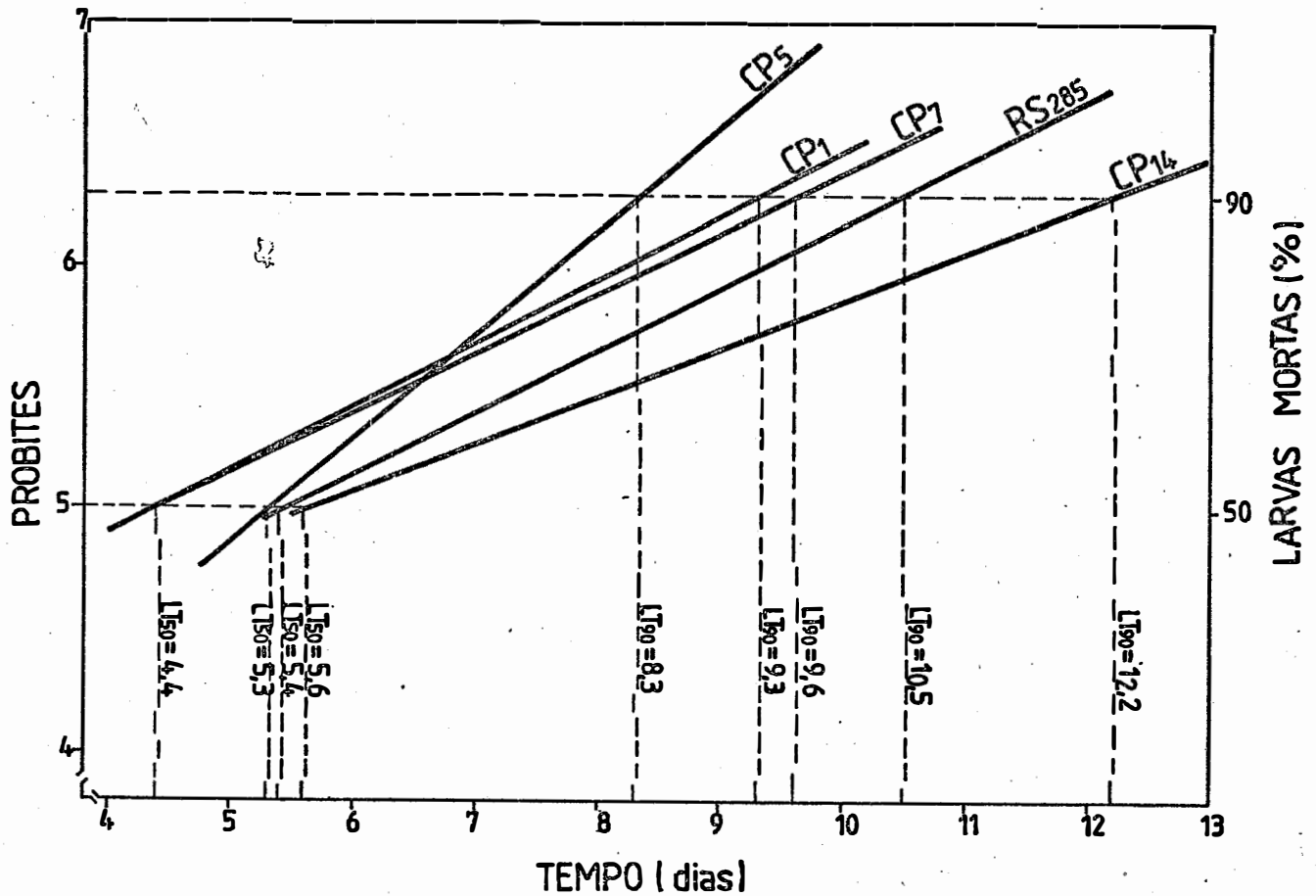


Figura 19. Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de  $10^7$  conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF, Goiânia, GO. 1986

$$CP_5 \quad Y = 2,7380 + 0,4278 X$$

$$RS \ 285 \ Y = 3,6556 + 0,2498 X$$

$$CP_{14} \quad Y = 3,9019 + 0,1848 X$$

$$CP_7 \quad Y = 3,9081 + 0,2474 X$$

$$CP_1 \quad Y = 3,8603 + 0,2588 X$$

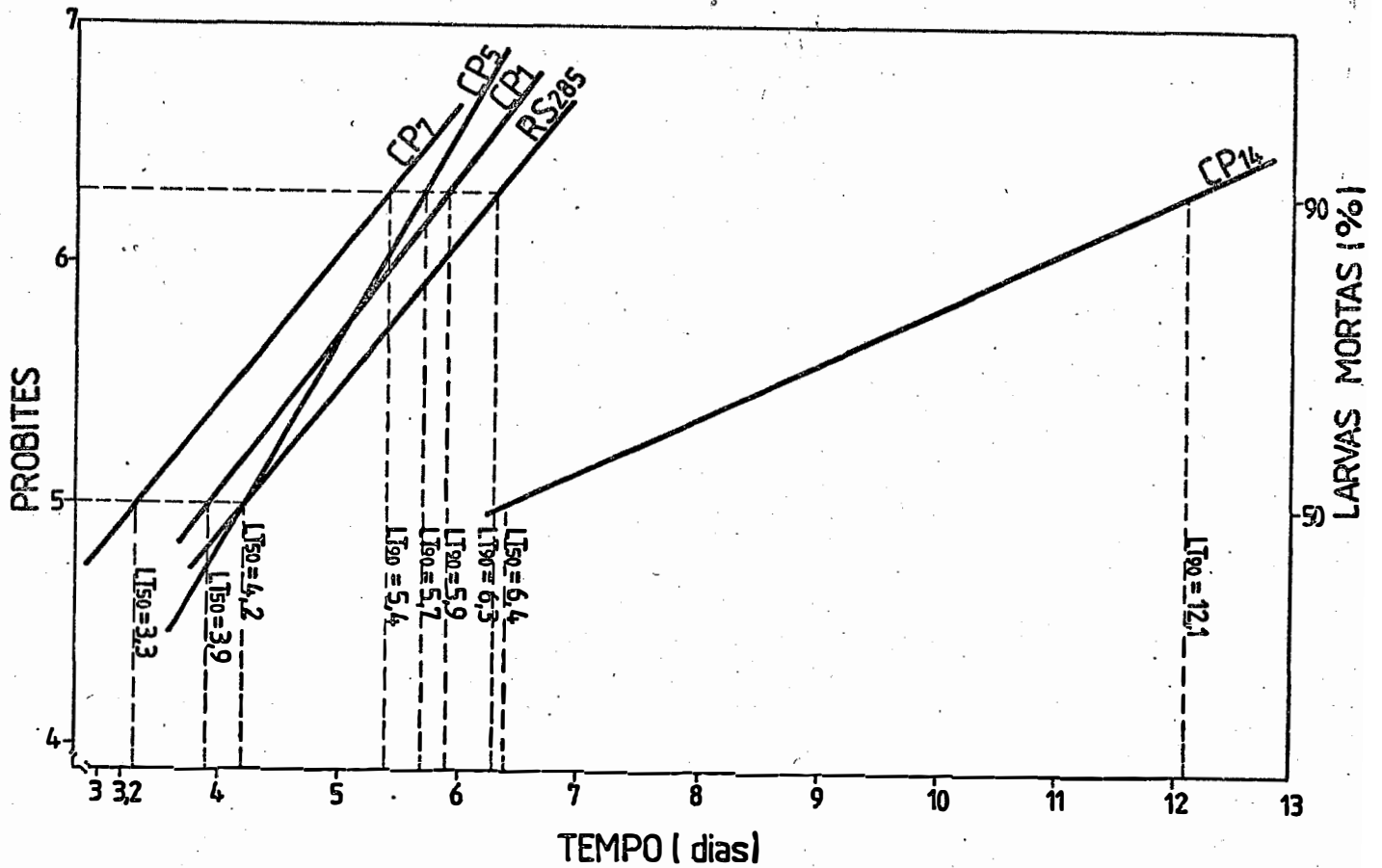


Figura 20. Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. basiana*, pulverizados na dosagem de  $10^8$  conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF, Goiânia, GO, 1986.

CP<sub>5</sub>      Y = 1,3638 + 0,8580 X

RS 285    Y = 2,5236 + 0,5917 X

CP<sub>14</sub> 10<sup>8</sup> Y = 3,5755 + 0,2232 X

CP<sub>7</sub> 10<sup>8</sup>    Y = 2,8664 + 0,6370 X

CP<sub>1</sub> 10<sup>8</sup>    Y = 2,3959 + 0,6575 X

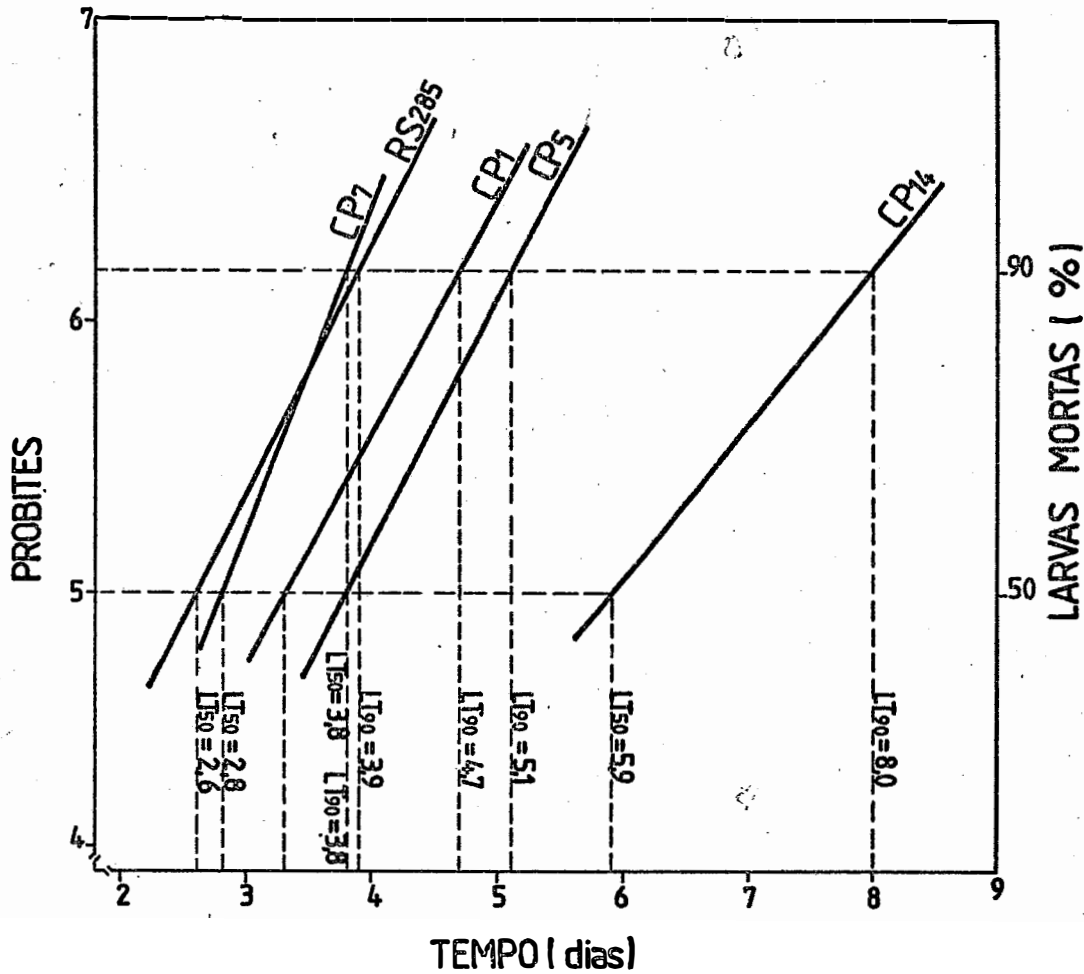


Figura 21. Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de  $10^9$  conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*, CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

$$CP_5 \quad Y = 1,0628 + 1,0267 X$$

$$RS \ 285 \ Y = 2,3569 + 0,9993 X$$

$$CP_{14} \quad Y = 1,3174 + 0,6183 X$$

$$CP_7 \quad Y = 1,5706 + 1,2334 X$$

$$CP_1 \quad Y = 2,0601 + 0,7887 X$$

gens, foi repetida para confirmação dos resultados. No segundo bioensaio, os níveis de mortalidade acumulada, aos 14 dias da aplicação diferiram significativamente pelo teste de Tukey, com maior eficiência para as dosagens mais altas ( $10^8$  e  $10^9$ ) para todos os isolados. O isolado RS 285 (cultura monospórica da formulação de Boverin) matou menos insetos na dosagem de  $10^8$  do que os demais isolados. Ao confirmar os níveis da mortalidade por infecção de *B. bassiana*, observa-se que a relação de eficiência entre isolados e dosagem é mantida, além de evidenciar o melhor desempenho de CP<sub>5</sub> ( $10^9$ ), CP<sub>1</sub> e CP<sub>5</sub> ( $10^8$ ), que não diferiram significativamente pelo teste de Tukey (Tabela 13).

A análise de próbites nesse segundo teste de isolados confirmou a superioridade de CP<sub>5</sub>, CP<sub>1</sub> e CP<sub>7</sub> sobre os demais, além do melhor desempenho da dosagem mais alta ( $10^9$ ). Com uma concentração de  $10^7$  conídios/ml não seria possível matar 50% dos insetos antes do oitavo dia. Os melhores desempenhos ocorreram para as cepas CP<sub>1</sub> e CP<sub>5</sub>, com LT<sub>50</sub> de 8,5 a 9 dias, respectivamente (Figura 22). Os isolados CP<sub>7</sub> e CP<sub>1</sub> sobressaíram-se em relação aos demais quanto ao LT<sub>50</sub> e LT<sub>90</sub>, na dosagem intermediária ( $10^8$ ). O isolado CP<sub>7</sub> necessitou de 5,1 e 6,6 dias para matar 50 e 90% dos insetos, enquanto que para CP<sub>1</sub> esses valores corresponderam a 5,6 e 7,0 dias respectivamente. O isolado CP<sub>5</sub> apresentou desempenho relativamente inferior, com 7,3 dias para LT<sub>50</sub> e 9,6 dias para LT<sub>90</sub>.

Tabela 13. Mortalidade acumulada de larvas de *C. aeneus*, pulverizadas com três dosagens de diferentes isolados de *B. bassiana*, número de larvas com infecção confirmada e taxa de potência. CNPAF, Goiânia, GO, 1986.

Número do Isolado	Número Inicial de Larvas	Dosagens (Conídios/ml <sup>2</sup> )	Mortalidade Acumulada <sup>1</sup>				Número de Larvas com Infecção Confirmada <sup>1</sup>	Taxa de Potência (UP)
			Dias após Pulverização					
			3	9	14	14		
CP1	39	10 <sup>7</sup>	2	30	38 ab	34 abc	1054	
CP5 <sup>2</sup>	35	10 <sup>7</sup>	0	20	30 abc	27 bcd	1000	
CP7	38	10 <sup>7</sup>	0	18	30 abc	31 abc	878	
CP14	40	10 <sup>7</sup>	0	11	23 c	19 d	668	
RS 285	36	10 <sup>7</sup>	0	12	26 bc	25 cd	800	
CP1	39	10 <sup>8</sup>	0	39	39 a	39 a	1303	
CP5	40	10 <sup>8</sup>	1	29	40 a	39 a	1000	
CP7	38	10 <sup>8</sup>	1	38	38 a	37 ab	1431	
CP14	39	10 <sup>8</sup>	1	32	38 a	37 ab	829	
RS 285	38	10 <sup>8</sup>	0	12	32 abc	32 abc	760	
CP1	38	10 <sup>9</sup>	1	38	38 a	38 ab	1000	
CP5	40	10 <sup>9</sup>	0	40	40 a	40 a	1000	
CP7	39	10 <sup>9</sup>	0	39	39 a	36 abc	1043	
CP14	40	10 <sup>9</sup>	2	30	38 a	38 ab	615	
RS 285	38	10 <sup>9</sup>	2	31	38 a	35 abc	679	
Testemunha	39	-	2	9	10 d	1 e		

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

<sup>2</sup>Isolado padrão.

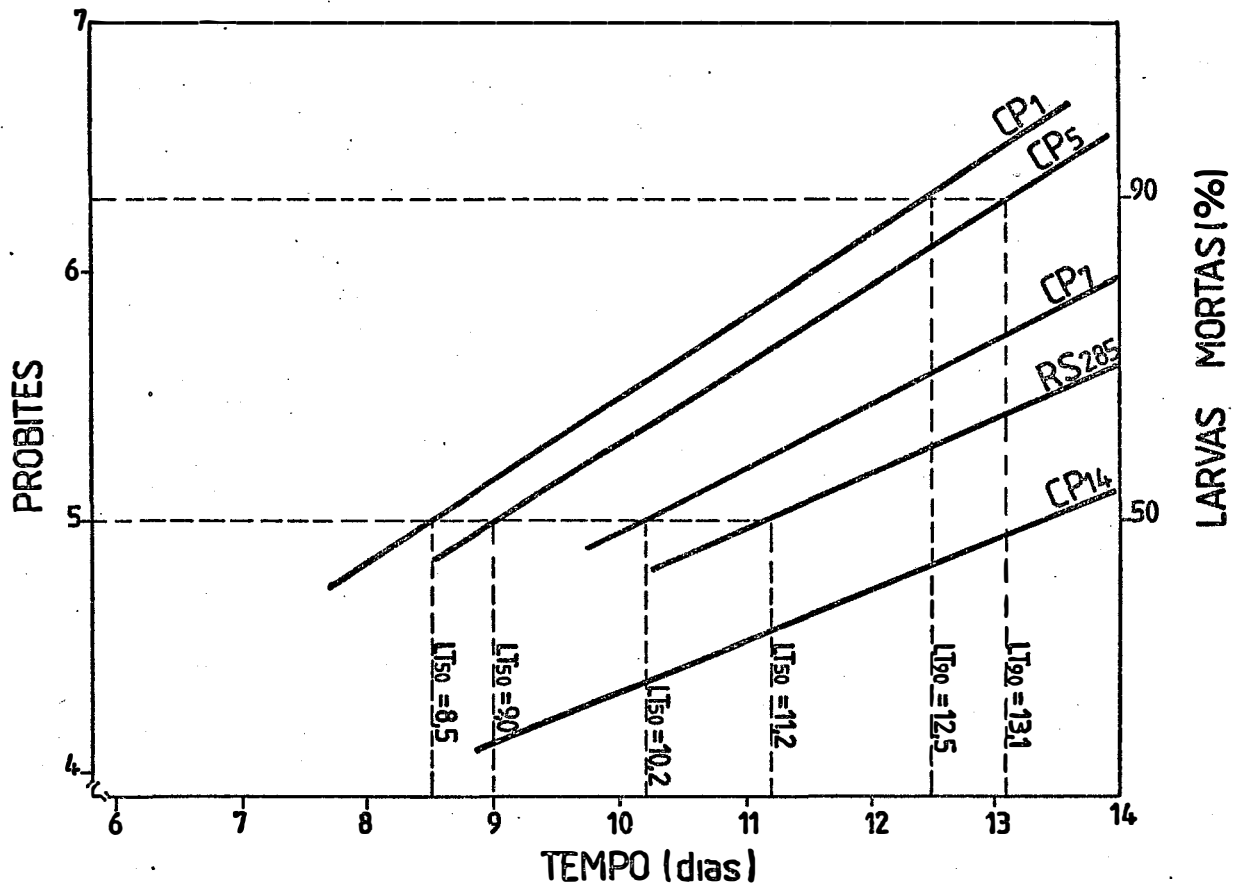


Figura 22. Tempos letais 50 e 90% para difetentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de  $10^7$  conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

CP <sub>5</sub>	$Y = 2,1963 + 0,3127 X$
RS 285	$Y = 2,2840 + 0,2425 X$
CP <sub>14</sub>	$Y = 2,5051 + 0,1854 X$
CP <sub>7</sub>	$Y = 2,2255 + 0,2714 X$
CP <sub>1</sub>	$Y = 2,3017 + 0,3184 X$

(Figura 23). A dosagem  $10^9$  conídios/ml foi a mais eficiente para os três melhores isolados, com tempos letais não superiores a 6,2 dias para controlar até 90% da população do inseto, na fase larval. Nesse segundo bioensaio os isolados de *B. bassiana* CP<sub>1</sub>, CP<sub>5</sub> e CP<sub>7</sub> destacaram-se, com as taxas de potência muito semelhantes entre si, na concentração de  $10^9$  conídios/ml (Tabela 13, Figura 24).

Para o teste dos isolados de *B. bassiana* no controle de *C. aeneus* na fase adulta, ficou evidenciado especificidade entre fases de desenvolvimento do inseto, importantes ao programar seu controle. Os resultados dessas concentrações dos isolados testados em larvas são muito superiores quando comparado ao controle obtido para o inseto na fase adulta. Os níveis de mortalidade foram muito baixos, mesmo tendo-se estendido o período de acompanhamento do bioensaio por 48 dias (Tabela 14).

Pode-se observar, para todos os isolados, que a dosagem de  $10^7$  conídios/ml não foi suficiente para matar 50% dos insetos. Na dosagem de  $10^8$  conídios/ml o isolado CP<sub>7</sub> foi o mais eficiente no controle dos adultos, entretanto, na dosagem de  $10^9$  conídios/ml, o isolado RS 285 sobressaiu-se em relação aos outros isolados. O pior desempenho ficou para o isolado CP<sub>5</sub> na dosagem de  $10^7$  e  $10^9$  conídios/ml.



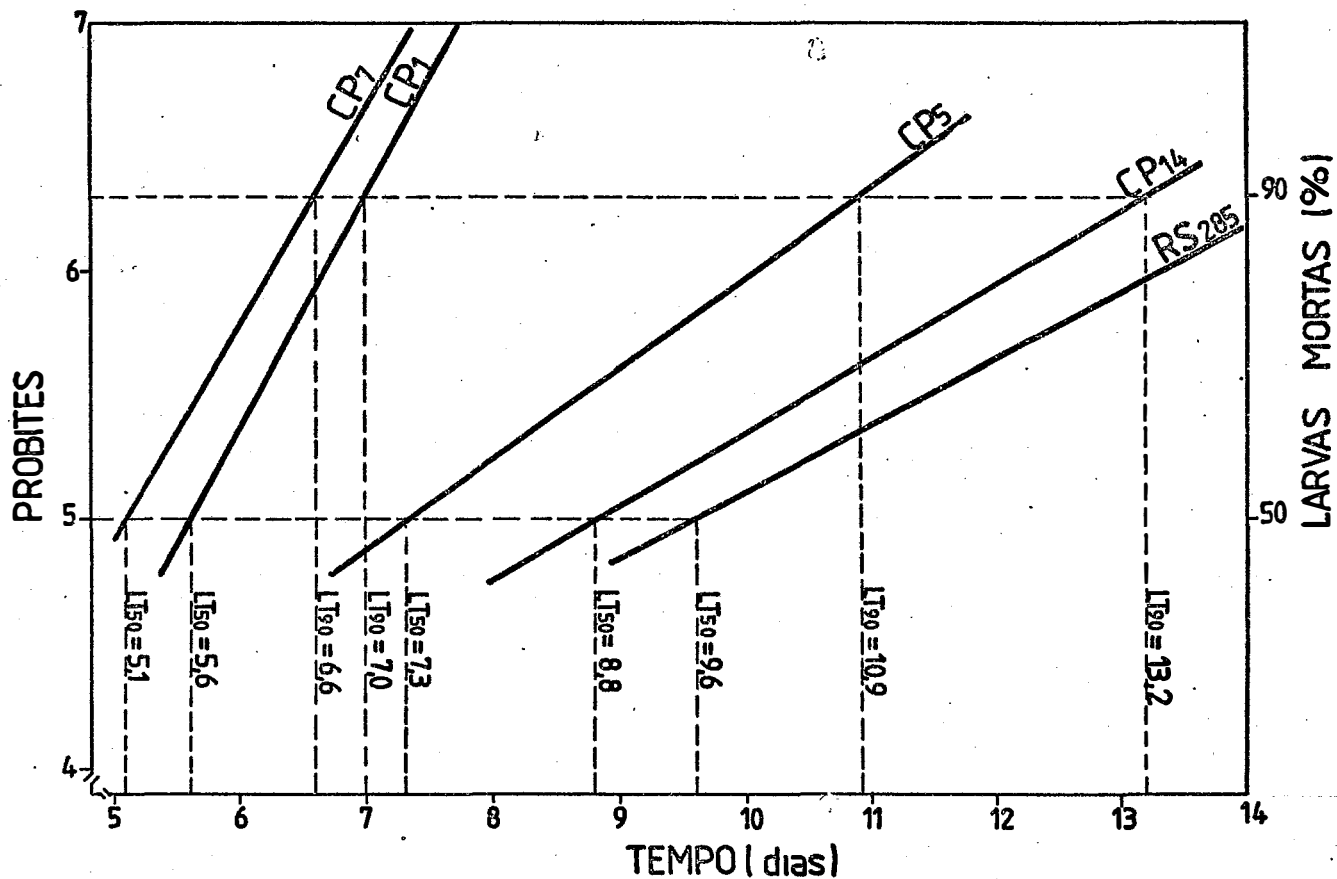


Figura 23. Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de  $10^8$  conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

CP <sub>5</sub>	$Y = 2,3513 + 0,3614 X$
RS 285	$Y = 2,4467 + 0,2664 X$
CP <sub>14</sub>	$Y = 2,3845 + 0,2959 X$
CP <sub>7</sub>	$Y = 0,5011 + 0,8806 X$
CP <sub>1</sub>	$Y = 0,1046 + 0,8754 X$

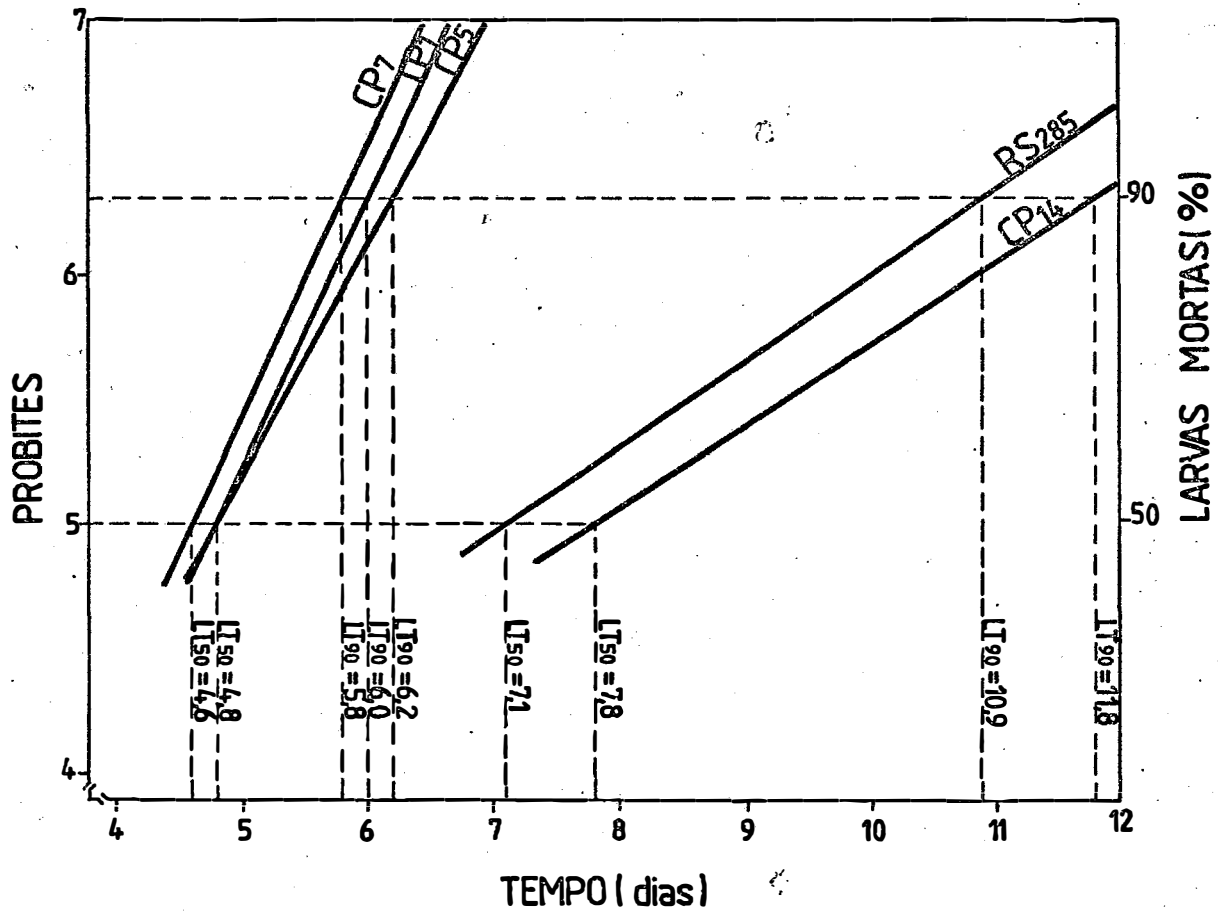


Figura 24. Tempos letais 50 e 90% para diferentes isolados de *B. bassiana*, pulverizados na dosagem de  $10^9$  conídios/ml em larvas do último instar de *C. aeneus*. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

$$\begin{aligned} \text{CP}_5 & Y = 0,3207 + 0,9662 X \\ \text{RS 285} & Y = 2,6156 + 0,3375 X \\ \text{CP}_{14} & Y = 2,4878 + 0,3214 X \\ \text{CP}_7 & Y = 0,1657 + 1,0595 X \\ \text{CP}_1 & Y = -0,1030 + 1,0685 X \end{aligned}$$

Tabela 14. Mortalidade acumulada de adultos de *C. aeneus*, pulverizadas com três dosagens de diferentes isolados de *B. bassiana* e número de adultos com infecção confirmada. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Número do Isolado	Número Inicial de Adultos	Dosagens (Conídios/mL)	Mortalidade Acumulada <sup>1</sup>			Número de Adultos com Infecção Confirmada <sup>1</sup>
			4	24	48	
CP1	37	10 <sup>7</sup>	2	11	16 abcd	15 abcde
CP5	40	10 <sup>7</sup>	0	0	1 d	1 e
CP7	38	10 <sup>7</sup>	0	13	18 abcd	18 abcd
CP14	39	10 <sup>7</sup>	0	5	7 cd	7 cde
RS 285	38	10 <sup>7</sup>	0	4	6 cd	5 de
CP1	37	10 <sup>8</sup>	0	9	12 bcd	8 bcde
CP5	38	10 <sup>8</sup>	0	8	10 bcd	9 bcde
CP7	39	10 <sup>8</sup>	0	17	23 abc	22 abc
CP14	38	10 <sup>8</sup>	0	9	16 abcd	12 bcde
RS 285	34	10 <sup>8</sup>	0	8	8 cd	7 cde
CP1	38	10 <sup>9</sup>	2	20	26 ab	24 ab
CP5	30	10 <sup>9</sup>	1	16	17 abcd	14 abcde
CP7	39	10 <sup>9</sup>	0	24	27 ab	23 abc
CP14	40	10 <sup>9</sup>	0	19	23 ab	19 abcd
RS 285	40	10 <sup>9</sup>	0	26	32 a	29 a
Testemunha	40	-	0	0	5d	0,0 e

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

## 5. CONCLUSÕES

5.1. A sobrevivência de conídios de *Beauveria bassiana* no solo é menor quanto mais elevada a temperatura e a percentagem de saturação de água.

5.2. *Beauveria bassiana* inibe o crescimento de bactérias e actinomicetos no solo.

5.3. Fungos e actinomicetos interferem na sobrevivência de *Beauveria bassiana* no solo.

5.4. Solos cobertos ou com plantas propiciam maior proteção à *B. bassiana* que solos desnudos. Consequentemente, a adoção de práticas culturais que propiciem maior cobertura do solo é importante para proteção de fungos entomopatogênicos que se encontram no solo.

5.5. A temperatura no solo é um dos principais fatores que afetam a permanência de *Beauveria bassiana* em condições de campo.

5.6. O modo de aplicação de *Beauveria bassiana* em solo desnudo não interfere na sua sobrevivência em condições de campo.

5.7. A fase larval de *C. aeneus* é mais suscetível a *B. bassiana* que a fase adulta.

5.8. Os isolados CP<sub>1</sub>, CP<sub>5</sub> e CP<sub>7</sub> foram os mais eficientes no controle de larvas de *Chalco~~o~~dermus aeneus*.

5.9. Os isolados CP<sub>7</sub> e RS 285 apresentaram o melhor desempenho no controle de adultos de *C. aeneus*.

6. LITERATURA CITADA

ALVES, S.B., 1980. Alguns fatores que afetam o controle microbiano de insetos. In: V Encontro Nacional de Entomologia do IAA (PLANALSUCAR). Itajaí, SC. p.215-264.

ALVES, S.B. ed., 1986. *Controle microbiano de insetos*. Editora Manole Ltda, São Paulo. 407p.

BAKERSPIGEL, A., 1953. Soil as a storage medium for fungi. *Mycologia*, 45:596-604.

BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1970. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. *J. Invert. Pathol.*, 15:447-50.

BELL, J.V.; HAMALLE, R.J. e J.A. ONSAGER, 1972. Mortality of larvae and pupae of the banded cucumber beetle in soil and sand following topical application of fungus spores. *J. Econ. Entomol.* 65(2):605-6.

- BURGES, H.D. e E.M. THOMSON, 1971. Standardization and assay of microbial insecticides. In: \_\_\_\_\_ e HUSSEY, N.W.. *Microbial control of insects and mites*, Academic Press, London, p.591-622.
- BURGES, H.D. e N.W. HUSSEY, eds. 1971. *Microbial control of Insects and Mites*. Acad. Press, New York. 861p.
- BURGES, H.D., ed. 1981. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Acad. Press, New York. 949p.
- CLERK, G.C., 1969. Influence of soil extracts on the germination of conidia of the fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.*, 13:120-4.
- CLERK, G.C. e M.F. MADELIN, 1965. The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 48(2):193-209.
- CORREA, G.S., 1983. Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Tese de Mestrado. Piracicaba, SP. 85p.
- COUCH, T.L. e C.M. IGNOFFO, 1981. Formulations of insect pathogens. In: BURGES, H.D. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, New York. p.621-34.

- CUTHBERT, F.P. e R.L. FERY, 1975. CR 17-1-13, CR 18-13-1, CR 22-2-21, cowpea curculio resistant southernpea germplasm. *Hortscience*, 10(6):628.
- 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 mosquitoes. *J. Invert. Pathol.*, 41:143-50.
- DAOUST, R.A. e R.M. PEREIRA, 1986. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pest stored outdoors and in laboratory in Brazil. *Environ. Entomol.*, 15:642-647.
- DAZZO, Y.B. s/d. *Soil microbiology laboratory manual*. East Lansing. Michigan State University - Dept. Microbiol. Public. Health.
- DIOMANDÉ, T., 1969. Contribution a l'étude du developpement de la muscardine verte a *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN (Fungi Imperfecti) des larves d'*Oryctes monoceros* OL. (Coléoptère: Scarabaeidae). *Bulletin de l'I.F.A.N.* T XXXI, sér. A, 4:1381-1404.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, Rio de Janeiro, R.J. 1979. *Manual de métodos de análise de solo*. Rio de Janeiro, n.p.



- FARGUES, J. e P.H. ROBERT., 1985. Persistence des conidiospores des hyphomycètes entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Nomuraea rileyi* (F.) Samson et *Paecilomyces fumosoroseus* Wize dans le sol, en conditions contrôlées. *Agronomie*, 5(1):73-80.
- FARGUES, J.; REISINGER, O.; ROBERT, P.H. e C. AUBART, 1983. Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: Influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospore survival in soil. *J. Invert. Pathol.*, 41:131-142.
- FERRON, P., 1974. Essai de lutte microbiologique contre *Melolontha melolontha* par contamination du sol à l'aide de blastospores de *Beauveria tenella*. *Entomophaga*, 19(I): 103-14.
- FERRON, P., 1977. Lutte microbiologique contre le hanneton commun. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM CROP PROTECTION, 19 Gand, Belgique, 1977. *Proceedings*. Gand.
- FERRON, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.*, 23:409-42.
- FORSYTHE, W.M. 1975. *Manual de laboratório de física de suelos*. Turrialba, IICA. 212p.

- FRANZ, J.M., 1971. Influence of environment and modern trends in crop management on microbial control. In: BURGESS, H.D. e HUSSEY, N.W. *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, London. p.407-44.
- GOTTWALD, T.R. e W.L. TEDDERS, 1984. Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. *Environ. Entomol.*, 13:557-60.
- HEIMPEL, A.M., 1965. Microbial control of insects. *World Rev. Pest Control*, 4:150-61.
- IGNOFFO, C.M.; PUTTLER, B.; MARSTON, N.L.; HOSTETTER, D.L. e W.A. DICKERSON, 1975. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria nileyi* associated with noctuid pests of soybeans. *J. Invert. Pathol.*, 25:135-7.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D.L. e R.E. PINNELL, 1977. Laboratory studies of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*: Soil-born contamination of soybean seedlings and dispersal of diseased larvae of *Trichoplusia ni*. *J. Invert. Pathol.*, 29:147-52.

IGNOFFO, C.M. e D.L. HOSTETTER, 1977. Environmental stability of microbial insecticides. In: SYMPOSIUM ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, Minneapolis, 1974. (Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.).

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D.L. e R.E. PINNELL, 1978. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, in and on soil. *Environ. Entomol.*, 7: 724-27.

JOUSIER, D. e G. CATROUX, 1976. Mise au point d'un milieu de culture pour le dénombrement de *Beauveria tenella* dans le sols. *Entomophaga*, 21(3):223-5.

KÜHNELT, W., 1963. Soil-inhabiting Arthropoda. *Ann. Rev. Entomol.*, 8:115-36.

LATCH, G.C. M. e R.E. FALLON, 1976. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. *Entomophaga*, 21(1):39-48.

LINGG, A.J. e M.D. DONALDSON, 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *J. Invert. Pathol.*, 38:191-200.

MICROBIAL insect control agents. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Washington, DC. *Microbial processes: promising technologies for developing countries*. Washington, D.C., 1979. p.80-106.

- MILNER, R.J. e G.G. LUTTON, 1976. *Metarhizium anisopliae*: survival of conidia in the soil. In: ANNUAL MEETING ON INVERTEBRATE PATHOLOGY, 9., Queens, Canada, 1976. Queens, Queen's University.
- MOREIRA, J.A.A., 1982. Retenção e movimento de água em solo podzólico vermelho amarelo. Recife, UFPe, 100p. (Tese de Mestrado).
- MOSCARDI, F., 1983. Microbial control of insect pests in grain legume crops. In: INTERNATIONAL WORKSHOP IN INTEGRATED PEST CONTROL FOR GRAIN LEGUMES, Goiânia, 1983. *Proceedings...* Brasília, EMBRAPA-DDT. p.189-222.
- NEVES, B.P. das e E.E. WATT, 1981. *Damage from the cowpea curculio (Chalcodermus sp.) in southern pea and common beans.* s.l., s.ed. 5f.
- OLIVEIRA, D.P. de, 1979. *Sobrevivência do Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin em rizosfera de gramíneas forrageiras.* Viçosa, UFV, 54p. (Tese de Mestrado).
- OLIVEIRA, D.P. de; CHAVES, G.M.e E.G. LOURES, 1981. Estudo comparativo da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em diferentes tipos de solo. *R. Theobroma*, 11(1):233-9.

- OLIVEIRA, L.B., 1968. Determinação da macro e microporosidade pela "MESA DE TENSÃO" em amostras de solo com estrutura indeformada. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3(1):197-200.
- PEREIRA, J.C.R.; DHINGRA, O.R. e G.M. CHAVES, 1979. A selective medium for population estimations of *Metarhizium* in soil. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 72(3):495.
- REISINGER, O.; FARGUES, J.; ROBERT, P. e M.F. ARNOULD, 1977. Effet de l'argile sur la conservation des microorganismes. I. Étude ultrastructurale de la biodegradation dans le sol de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Ann. Microbiol.*, 128 B(2):271-287.
- RICHARDS, L.A. Pressure membrane apparatus construction and use. *Agricultural Engineering*, 28:451-4, 1947.
- ROBERTS, D.W. e W.G. YENDOL, 1971. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D. e HUSSEY, N.W. *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, London. p. 125-49.
- ROBERTS, D.W. e A.S. CAMPBELL, 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 10(3):19-75.

- SHIELDS, M.S.; LINGG, A.J. e R.C. HEIMSCH, 1981. Identification of a *Penicillium urticae* metabolite which inhibits *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Pathol.*, 38:374-7.
- SPRENKEL, R.K. e W.M. BROOKS, 1977. Winter survival of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in North Carolina. *J. Invert. Pathol.*, 29:262-6.
- TEDDERS, W.L.; WEAVER, D.J. e E.J. WEHUNT, 1973. Pecan weevil: suppression of larvae with the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and the nematode *Neoplectana dutkyi*. *J. Econ. Entomol.*, 66(3):723-5.
- WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F. e W.J. STAMBAUCH, 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invert. Pathol.*, 16:221-6.
- WATT, B.A. e R.A. LeBRUN, 1984. Soil effects of *Beauveria bassiana* on pupal populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, 13:15-18.

7. APÉNDICES

Tabela A1. Teores de umidade em porcentagem por volume, obtidos por secagem, de amostras com estrutura deformada (T.F.S.A.) nas tensões estudadas. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

% Umidade (g/g)	Repetição	Tensão (bar)														
		0,01	0,03	0,06	0,1	0,3	0,7	1,0	3,0	5,0	10	15				
1	1	49,50	42,74	35,93	31,21	25,23	23,20	21,60	19,09	19,75	19,80	20,15				
	2	51,59	39,80	35,04	30,88	26,08	21,85	21,92	19,54	19,78	20,06	20,50				
	3	51,48	38,76	37,62	29,16	25,43	22,68	21,57	19,22	19,63	19,91	19,67				
	Média	50,86	40,43	35,48	30,40	25,58	22,58	21,69	19,28	19,72	19,92	20,10				



Tabela A2. Número médio de colônias ( $\times 10^4$ ) de bactérias, fungos e actinomicetos em solo autoclavado e não autoclavado, e solo com e sem inóculo de *B. bassiana*, em vários períodos de amostragem (Média de 3 repetições). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Dias de Amostragem	Solo					
	Autoclavado			Não Autoclavado		
	Fungos	Bactérias	Actinomicetos	Fungos	Bactérias	Actinomicetos
8	16,73	80,67	65,07	2,80	385,33	149,33
24	20,93	120,67	23,93	3,00	140,00	24,80
38	35,40	143,33	82,87	3,07	72,20	31,73
52	47,67	142,80	440,00	4,0	132,00	38,73
80	43,13	28,47	189,87	4,07	64,77	28,43
129	33,80	296,67	245,27	5,64	140,67	23,87
Média	32,94	135,43	174,50	3,76	155,83	49,48

Continuação da Tabela A2.

Dias de Amostragem	Solo					
	Com <i>B. bassiana</i>			Sem <i>B. Bassiana</i>		
	Fungos	Bactérias	Actinomicetos	Fungos	Bactérias	Actinomicetos
8	2,50	230,00	86,72	20,67	237,50	137,87
24	8,22	96,67	10,78	17,58	180,83	44,75
38	18,94	54,44	41,89	19,67	187,75	80,42
52	23,61	50,67	88,11	29,17	267,50	466,25
80	22,94	38,37	82,47	24,58	59,00	149,17
129	21,64	325,55	85,89	16,83	58,33	207,58
Média	16,31	132,62	65,98	21,42	165,15	181,00

Tabela A3. Número médio de colônias ( $\times 10^3$ ) de *B. bassiana*, em condições de campo, com e sem plantas de caupi, *B. bassiana* aplicado na superfície e misturado ao solo, em onze avaliações no tempo (Média de 6 repetições). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Dias de Avaliações	Sem <i>B. bassiana</i> (Testemunha)			Com <i>B. bassiana</i>		
		Com Planta Superfície	Sem Planta no Solo Misturado	Com Planta Superfície	Sem Planta no Solo Misturado	
0	10,00 b	690,00 a	370,00 a	735,00 a	106,67 a	
9	0,28 b	134,79 a	106,67 a	187,78 a	106,67 a	
17	0,11 b	41,33 a	45,13 a	57,00 a	45,13 a	
24	0,04 b	29,29 a	37,61 a	36,83 a	37,61 a	
38	0,02 b	13,11 a	2,07 b	3,11 b	2,07 b	
45	0,00 b	6,13 a	0,58 b	0,23 b	0,58 b	
52	0,00 b	9,00 a	1,43 b	1,16 b	1,43 b	
59	0,00 b	5,40 a	0,16 b	0,21 b	0,16 b	
73	0,00 b	5,10 a	0,20 b	0,39 b	0,20 b	
80	0,00 b	6,09 a	0,01 b	0,07 b	0,01 b	
94	0,01 b	2,47 a	0,55 b	0,13 b	0,55 b	

Tabela A4. Análise de variância para as avaliações de fungos bactérias e actinomicetos em solo com e sem plantas de caupi. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Fungos		Bactérias		Actinomicetos	
		SQ	Valor de F	SQ	Valor de F	SQ	Valor de F
Repetição (REP)	2	22,33	0,42	124,00	0,70	262,33	9,26**
Planta (PL)	1	2,00	0,08	206,72	2,34	2,72	0,19
PL x REP	2	44,33	0,84	328,44	1,86	1093,44	38,59**
Valor de F			0,52		1,49		19,18**
R <sup>2</sup>			17,79%		38,35%		88,88
C.V.			28,56		64,79		18,66

\*\* Significativo a 99% de probabilidade.

Tabela A5. Número de colônias ( $\times 10^4$ ) de bactérias, fungos e actinomicetos isolados do solo com e sem *B. bassiana*, a 25°C e 25% de saturação, em solo autoclavado e não autoclavado, em vários períodos de amostragem.

Dias de Amostragem	Solo Autoclavado					
	Com <i>B. bassiana</i>			Sem <i>B. bassiana</i>		
	Bactérias	Fungos	Actinomicetos	Bactérias	Fungos	Actinomicetos
8	4,40	2,78	2,89	195,00	37,67	158,33
24	33,33	14,11	0,55	296,67	31,17	59,00
38	28,89	34,78	46,67	315,00	36,33	137,17
52	11,33	43,00	142,22	340,00	54,67	886,67
80	26,55	41,89	137,00	31,33	45,00	269,17
129	472,22	36,55	153,22	33,33	29,67	383,33
Média	91,13	28,85	80,42	201,89	39,08	315,61