**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

Giuliano Pauli

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia**

**Piracicaba
2009**

Giuliano Pauli
Biólogo

Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

Orientador:
Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JR.

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pauli, Giuliano

Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae) / Giuliano Pauli. - - Piracicaba, 2009.
88 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Baculoviridae 2. Brocas - Insetos nocivos 3. Cana-de-açúcar 4. Controle biológico
Fungos entomopatogênicos 6. Pragas de plantas 7. Vírus dos insetos I. Título

CDD 632.78
P327i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo pelas condições oferecidas.

A todos os integrantes das famílias Pauli e Cavioli pelo inestimável carinho, em especial aos meus pais, Donizete e Elaine, e minha irmã Giovana.

Ao Prof. Sérgio Batista Alves (in memoriam), pela orientação, confiança, amizade e respeito demonstrados durante nosso convívio.

Ao Prof. Italo Delalibera Júnior pela orientação, amizade e paciência.

Ao Prof. Sinval Silveira Neto pela amizade e ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Entomologia pelos preciosos ensinamentos.

À Bióloga Solange Aparecida Vieira Barros pela amizade e apoio durante a realização dos trabalhos.

A todos os colegas do laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos: Daian, Daniella, Gabriel, Janaina, Janayne, Luciana, Marcel, Marcelo, Melissa, Michele, Ricardo, Rogério, Samuel e Thiago.

Aos meus amigos da República Kantagalo e de Santa Bárbara d’Oeste.

À Vanessa da Silveira Duarte pelo carinho, paciência e companheirismo.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Sílvia Zinsly pela correção da estrutura deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Cana-de-açúcar e <i>Diatraea saccharalis</i>	11
1.2 Patógenos comumente associados à <i>Diatraea saccharalis</i>	12
1.3 Diferença de suscetibilidade de populações de insetos a entomopatógenos.....	14
1.4 Dinâmica da doença em infecções múltiplas.....	16
Referências	21
2 INTERAÇÃO DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS DE <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE): <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.), <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) E GRANULOVÍRUS.....	31
Resumo	31
Abstract	31
2.1 Introdução	32
2.2 Material e métodos	34
2.2.1 Insetos.....	34
2.2.2 Fungos	34
2.2.3 Vírus.....	35
2.2.4 Virulência dos patógenos isolados e em mistura	36
2.2.4.1 Virulência de DsGV, DsGV + <i>M. anisopliae</i> , DsGV + <i>B. bassiana</i> , DsGV + <i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i>	36
2.2.4.2 Virulência de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i>	37
2.2.5 Co-cultivo de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> <i>in vitro</i>	38
2.2.6 Co-infecção de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> <i>in vivo</i>	40
2.2.7 Virulência de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> e DsGV a <i>D. saccharalis</i> em plantas de milho aplicados isoladamente e em mistura	41
2.2.8 Análises estatísticas	41

2.3 Resultados.....	43
2.3.1 Virulência dos patógenos isolados e em mistura.....	43
2.3.2 Co-cultivo de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> <i>in vitro</i>	53
2.3.3 Co-infecção de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> <i>in vivo</i>	53
2.3.4 Virulência de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i>	57
2.4 Discussão	58
Referências.....	63
3 SUSCETIBILIDADE DE DUAS POPULAÇÕES DE LABORATÓRIO DE <i>D. saccharalis</i> (Fabr.) AOS FUNGOS <i>M. anisopliae</i> (Metsch.) E <i>B. bassiana</i> (Bals.).....	
Resumo	71
Abstract.....	71
3.1 Introdução.....	72
3.2 Material e Métodos	74
3.2.1 Insetos	74
3.2.2 Fungos.....	75
3.2.3 Bioensaios	77
3.2.3.1 Piracicaba, 2008	77
3.2.3.2 Piracicaba e Araras, 2009.....	77
3.2.3.3 Piracicaba, Araras e cruzamentos, 2009	78
3.2.4 Análises estatísticas	78
3.3 Resultados.....	79
3.3.1 Piracicaba, 2008	79
3.3.2 Piracicaba e Araras, 2009.....	79
3.3.3 Piracicaba, Araras e cruzamentos, 2009	81
3.4 Discussão	82
Referências.....	85

RESUMO

Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é naturalmente infectada por diversos patógenos, sendo os mais importantes *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) e vírus da granulose. Esses microrganismos podem co-infectar um mesmo indivíduo em condições de campo, mas os resultados das interações desses patógenos não são conhecidos. O presente trabalho objetivou determinar a virulência desses patógenos aplicados de forma isolada e em infecções mistas na fase larval de *D. saccharalis* em condições de laboratório sobre dieta artificial e em plantas de milho. A maioria das combinações resultou em efeito aditivo na mortalidade dos insetos (*M. anisopliae* + *B. bassiana*, *M. anisopliae* + DsGV e *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV), entretanto ficou evidenciado antagonismo entre *B. bassiana* e o granulovírus. Todos os cadáveres oriundos das aplicações associadas apresentaram sintomas de apenas um dos patógenos envolvidos na infecção. A produção de conídios de uma espécie de fungo nos cadáveres submetidos à co-infecção foi semelhante à produção de conídios da mesma espécie na infecção isolada. Na infecção mista, os dois fungos se desenvolveram na hemolinfa do hospedeiro, entretanto em um estágio tardio do processo infectivo ocorreu a exclusão de um dos patógenos. A infecção por *B. bassiana* diminuiu drasticamente a densidade de hemócitos circulantes na hemolinfa das lagartas, efeito não observado para *M. anisopliae*. Duas populações de laboratório de *D. saccharalis*, uma oriunda de Piracicaba-SP e outra de Araras-SP, foram testadas quanto à suscetibilidade aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. A população de insetos de Piracicaba foi menos suscetível em 2009 do que a mesma população em 2008 e também em relação à população de Araras. Dessa forma, foi realizado um bioensaio comparando a suscetibilidade de insetos das duas populações e da progênie (F1) dos cruzamentos diretos entre elas, criadas nas mesmas condições bióticas e abióticas, para determinar se a suscetibilidade diferencial estaria relacionada a fatores genéticos. Não foram observadas diferenças significativas na suscetibilidade das duas populações e dos cruzamentos aos fungos. A suscetibilidade diferencial observada nos dois primeiros bioensaios provavelmente esteja relacionada às variações no sistema de criação, em componentes nutricionais e antimicrobianos da dieta e não a variações entre as populações dos hospedeiros.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; *Diatraea saccharalis*; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Granulovírus; Infecção mista; Suscetibilidade diferencial; Populações

ABSTRACT

Interaction of *Metarhizium anisopliae* (Metsch), *Beauveria bassiana* (Bals.) and granulovirus, the main pathogens of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) is naturally infected by various pathogens, the most important are *Metarhizium anisopliae* (Metsch) (Ascomycota: Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) and granulovirus. These microorganisms may co-infect the same host under field conditions, but the result of these pathogens interactions is not known. This study investigated the virulence of these pathogens applied separately and together on larvae of *D. saccharalis* in the laboratory on artificial diet and on corn plants. Most combinations resulted in additive effect on insect mortalities (*M. anisopliae* + *B. bassiana*, *M. anisopliae* + DsGV and *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV), however it became apparent antagonism between *B. bassiana* and the granulovirus. In all cadavers resulted from mixed applications, only one pathogen sporulated or externalized their symptoms in the host. Production of conidia of one fungal species on the cadavers subjected to co-infection was similar to the production of conidia of the same species in a single infection. In mixed infection, the two fungi have developed in the hemolymph of the host, and the exclusion of one pathogen occurred at a later stage of the infective process. Infection with *B. bassiana* has drastically reduced the density of circulating hemocytes in the hemolymph of the larvae, which was not observed for *M. anisopliae*. Two laboratory populations of *D. saccharalis*, one coming from Piracicaba-SP and other from Araras-SP, were tested for susceptibility to *M. anisopliae* and *B. bassiana*. The insect population from Piracicaba was less susceptible to application of fungi in 2009 compared to the same population in 2008 and compared to the Araras population. Therefore, a bioassay was performed comparing the susceptibility of the two populations and the progeny (F1) of direct crossings between them, using insects reared in the same conditions. This assay was performed to determine if the differential susceptibility would be related to genetic factors. No significant differences were observed in the susceptibility of insect populations and crossings to both fungi. The differential susceptibility observed in the first two assays was probably related to variations in the rearing system and nutritional and antimicrobial components in the diet and not due to variations among host populations

Keywords: Sugarcane; *Diatraea saccharalis*; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Granulovirus; Mixed infection; Differential susceptibility; Populations

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cana-de-açúcar e *Diatraea saccharalis*

A crescente demanda mundial pela utilização de fontes renováveis de energia e por menor impacto ambiental vem aquecendo o agronegócio da cana-de-açúcar. O Brasil, em 2009, cultivou cerca de 7,741 milhões de hectares de cana-de-açúcar, área esta, 9,5% superior a da safra anterior, com produção prevista de 629,02 milhões de toneladas, com destaque para o estado de São Paulo que é responsável por 54,15% da área plantada e por 57,88% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2009).

Apesar da importância e rusticidade dessa cultura, a produção é prejudicada pela incidência de pragas, dentre as quais a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lep: Crambidae) destaca-se como a de maior importância. Os danos provocados por essa praga podem ser classificados em diretos e indiretos. Os danos diretos são caracterizados pela abertura de galerias no colmo, perda de peso, morte das gemas, tombamento de plantas pelo vento e secamento dos ponteiros (coração morto). Já os indiretos, são devidos à penetração de fungos através dos orifícios e galerias, ocasionando a podridão vermelha do colmo, resultando em perdas maiores do que aquelas causadas pelos danos diretos. Esses patógenos, principalmente *Colletotrichum falcatum* (Went, 1893) e *Fusarium verticillioides* (Nirenberg, 1976), degradam a sacarose diminuindo a pureza do caldo, competindo com as leveduras no processo fermentativo, com consequência negativa na produção de açúcar e álcool (GALLO et al., 2002; BOTELHO; MACEDO, 2002).

A lagarta neonata de *D. saccharalis* dirige-se para a região do cartucho da planta, permanecendo abrigada nessa região por uma a duas semanas, se alimentando pela raspagem da folha ou da casca do entrenó em formação, nesse intervalo sofre uma ou duas ecdises e posteriormente inicia a perfuração do colmo. *D. saccharalis* está mais sujeito a ação de entomopatógenos no período que compreende a fase de ovo até a entrada na galeria (BOTELHO; MACEDO, 2002).

Os efeitos adversos ao homem e ao ambiente decorrentes do emprego de inseticidas químicos para o controle da broca, têm levado a uma busca contínua de alternativas, visando à implementação de programas de manejo integrado de pragas

(MIP). Neste contexto, os entomopatógenos assumem um papel importante, seja pela sua ocorrência natural, como pela sua utilização como inseticidas biológicos (ALVES, 1998).

No Brasil, o controle da broca é feito principalmente por meio do parasitóide larval, *Cotesia flavipes* (Cameron; 1891) (Hymenoptera: Braconidae), o qual em algumas situações pode não ser tão eficiente, principalmente quando a predação de ovos por inimigos naturais é baixa, havendo necessidade de se utilizarem outros métodos para combatê-la (BOTELHO et al., 1999). Face à extensão das áreas infestadas, estão sendo realizadas pesquisas visando a integração de métodos de controle, e entre eles, o emprego de patógenos como fungos, vírus e bactérias vem ganhando importância, uma vez que são compatíveis com os métodos em uso, não interferindo na ação de parasitóides e predadores que já participam natural e significativamente do controle da praga. (ALMEIDA; BOTELHO; PAVAN, 1986).

1.2 Patógenos comumente associados à *Diatraea saccharalis*

A broca da cana-de-açúcar é naturalmente infectada por diversos patógenos, sendo os mais importantes *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) e vírus da granulose (ALVES, 1986; LECUONA; ALVES, 1988).

Dentre os mais de vinte grupos de vírus de insetos e ácaros conhecidos, destaca-se o grupo dos Baculovírus, importantes agentes de controle natural de mais de 600 espécies de insetos em várias ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (TANADA; KAYA, 1993). Produtos a base de Baculovírus tem sido utilizados contra insetos-praga, principalmente lepidópteros (MOSCARDI, 1999).

A família Baculoviridae é subdividida em dois gêneros: o Nucleopolyhedrovirus (vírus da poliedrose nuclear = NPV) e o Granulovirus (vírus de granulose = GV), sendo que as unidades infectivas virais encontram-se protegidas por cristais protéicos (corpos de oclusão) na forma de poliedros ou grânulos, respectivamente (MURPHY et al., 1995). Em contraste aos NPVs, cada vírion de GV geralmente contém um único nucleocapsídeo e apenas um vírion está incorporado no corpo de oclusão, denominado de cápsula ou grânulo (GRÖNER, 1986; BONNING, 2005)

Vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* (DsGV) foi citado pela primeira vez em larvas procedentes de Louisiana, EUA, em 1960 (STEINHAUS; MARSH, 1962). Estudos de laboratório constataram que o DsGV foi capaz de matar larvas de 3º instar com doses extremamente baixas, determinando uma DL_{50} de 42 cápsulas/larva (PAVAN et al., 1983a ;1983b).

Foram realizados experimentos de campo para avaliar a eficiência da aplicação do DsGV no controle da broca-da-cana, com parasitismo de até 26,8% de lagartas decorridos 30 dias da aplicação. Foram observados insetos contaminados pelo patógeno até 150 dias após a aplicação, que pode ter ocorrido por uma re-infestação do vírus no campo, procedente de larvas infectadas e mortas. (ALMEIDA; BOTELHO; PAVAN, 1986).

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* infectam naturalmente *D. saccharalis* de forma enzoótica. Na região nordeste do Brasil, em condições de temperatura e umidade favoráveis esses patógenos causam níveis de infecção de até 10% das lagartas presentes nos canaviais (ALVES; LOPES, 2008).

A broca-da-cana é muito sensível ao *M. anisopliae* que é capaz de infectar todas as fases de desenvolvimento do inseto. Almeida et al. (1984) determinaram em laboratório a eficiência do fungo sobre ovos do inseto com níveis de controle superiores a 90% (ALVES; LOPES, 2008). Almeida e Alves (1982) obtiveram um controle de 100% de lagartas quando inoculadas com *M. anisopliae* sugerindo o uso desse entomopatógeno em programas de controle biológico da broca.

Células leveduriformes e conídios de *B. bassiana* foram comparados quanto à virulência sobre *D. saccharalis*, na concentração de 10^7 células.mL⁻¹ a fase leveduriforme mostrou-se mais efetiva com 70% de mortalidade contra 30% de mortalidade por conídios. Já na concentração de 10^8 células.mL⁻¹, não foi observada diferença significativa entre a mortalidade ocasionada por estes dois tipos de propágulos (ALVES et al., 2002).

Conídios de *B. bassiana* armazenados em freezer ($-7 \pm 1^\circ\text{C}$) por 80 meses mantiveram a viabilidade e uma suspensão de 10^8 conídios.mL⁻¹ causou 94% de mortalidade em lagartas de *D. saccharalis* (MARQUES; ALVES; MARQUES, 2000). Estudando a preservação de formulações de *B. bassiana* durante sete anos, Alves et al.

(1996) concluíram que nas temperaturas de -10 a -7°C foram mantidas a viabilidade e virulência do fungo sobre *D. saccharalis*.

Testes de laboratório envolvendo a aplicação dos fungos *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch na concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹ e 10^6 OB.mL⁻¹ do vírus da granulose (DsGV) isoladamente e a combinação dos fungos com o vírus, comprovaram a melhoria na eficiência dos fungos com mortalidades de até 85,69%, não alterando a eficiência do vírus (LECUONA; ALVES, 1988).

Atualmente no Brasil existe uma preferência para a utilização de *B. bassiana* em relação a *M. anisopliae* para o controle de *D. saccharalis*, entretanto deveria ser discutido baseando-se em resultados de pesquisa, pois alguns isolados de *M. anisopliae* apresentam eficiência igual ou superior a isolados de *B. bassiana*, além da vantagem de serem efetivos na colonização da fase de ovo do inseto. Além disso, a tecnologia de produção de *M. anisopliae* já está bem estabelecida no Brasil visando a sua utilização no controle de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* que são pragas importantes da cultura. Assim seria importante a realização de criteriosos experimentos de campo comparando a eficácia dos dois patógenos no controle de *D. saccharalis*, com avaliações não apenas pontuais, mas também no longo prazo, para se determinar qual patógeno é o mais promissor para ser incluído no manejo integrado da praga.

1.3 Diferença de suscetibilidade de populações de insetos a entomopatógenos

Os fatores primários envolvidos no início e progressão das doenças infecciosas em insetos são: a virulência das populações de patógenos, eficiência da taxa de transmissão e a suscetibilidade da população do hospedeiro ao patógeno. Sendo todos esses fatores afetados pelas condições bióticas e abióticas do ambiente. Dentre as características da população do hospedeiro que afetam significativamente a dinâmica da infecção destacam-se a suscetibilidade e os parâmetros populacionais como densidade, comportamento e a associação com populações de outras espécies (WATANABE, 1987).

Existem na literatura poucos trabalhos que demonstram a diferença de suscetibilidade de duas ou mais populações de uma espécie de inseto a um mesmo entomopatógeno. Ossowski (1960) observou que um vírus da poliedrose nuclear foi

mais virulento para uma população de *Kotochalia junodi* (Heylaerts; 1890) (Lep: Psychidae) de uma localidade distante do local onde o vírus foi isolado quando comparado a uma população da mesma origem do isolado viral. Variações consideráveis de suscetibilidade de populações de campo de *Phthorimaea operculella* (Zeller; 1873) (Lep: Gelechiidae) foram observadas na resposta a aplicação de um GV (BRIESE, 1981). Hunter e Hoffmann (1973) testando um GV determinaram uma diferença de sete vezes na CL₅₀ entre duas populações de *Plodia interpunctella* (Hubner; 1813) (Lep: Pyralidae) de origens diferentes. Papierok e Winding (1979) reportaram diferenças entre dois clones do afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Harris; 1776). (Hemiptera: Aphididae) quanto à suscetibilidade a *Conidiobolus obscurus* (Hall & Dunn) Remaudiere & Keller. Milner (1982) estudando a mesma espécie de afídeo evidenciou diferenças de suscetibilidade entre dois biótipos de uma população de campo quanto à suscetibilidade para *Erynia neoaphidis* (Remaudière; Hennebert; 1980) (Zygomycetes: Entomophthorales).

Keller, Schweizer e Shah (1999) observaram diferenças significativas na virulência de 8 isolados de *B. brongniartii* para duas populações de *Melolontha melolontha* (Linnaeus; 1758) (Coleoptera: Scarabaeidae), uma originária da Itália e outra da Suíça. Os autores sugerem que a diferença de suscetibilidade pode estar relacionada com o histórico das populações e com a coexistência dessas com *B. brongniartii*.

Uma Devi et al. (2008) evidenciaram diferenças na virulência de cinco isolados de *B. bassiana* para diferentes populações de *Spodoptera litura* (Fabricius; 1775) (Lep: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* (Hübner; 1805) (Lep: Noctuidae). Cada espécie de inseto apresentou uma população mais suscetível, sendo a mesma para todos os isolados. Abelhas de colônias distintas tiveram mortalidades significativamente diferentes quando expostas a *Bacillus larvae* (ROTHENBUHLER; THOMPSON, 1956).

Uma população de laboratório de *Conoderus falli* (Lane) (Coleoptera: Elateridae) tratada com *Metarhizium anisopliae* apresentou um TL₅₀ significativamente maior do que uma população originária do campo (BELL; HAMALLE, 1971). Todas essas diferenças de suscetibilidade de colônias, populações, raças ou strains de uma espécie de inseto

para um patógeno exemplificadas acima, podem estar relacionadas ao grau de exposição ao patógeno durante muitas gerações (WATANABE, 1987).

1.4 Dinâmica da doença em infecções múltiplas

Até o momento os estudos sobre as interações entre patógeno e hospedeiro se restringiram a única espécie de patógeno, enquanto vem ficando cada vez mais claro que as infecções múltiplas são muito comuns na natureza (HUGHES; BOOMSMA, 2003). Os termos infecção concomitante, múltipla ou mista, tradicionalmente se referem a uma situação em que dois ou mais agentes infecciosos coexistem no mesmo hospedeiro, mas não incluem as situações onde os agentes infectantes pertencem a variantes geneticamente diferentes de uma mesma espécie. Uma visão mais atualizada do termo infecção mista permite a inclusão de linhagens geneticamente diferentes pertencentes a uma mesma espécie (COX, 2001).

Na natureza, infecções concomitantes são a regra (READ; TAYLOR, 2001; COX, 2001) e isso tem sido reconhecido há muito tempo, por exemplo, a infecção múltipla de ovos de helmintos foi detectada em coprólitos (fezes fossilizadas) e outros restos humanos em sítios pré-históricos (BROTHWELL; SANDISON, 1967; COCKBURN et al., 1998).

O que é menos conhecido é que existem numerosas interações, tanto de fácil visualização e compreensão, quanto sutis, entre os diferentes tipos de organismos. Este fato tem sido considerado por muito tempo por cientistas, incluindo entomologistas, que tentam utilizar animais livres de infecções, isentos de patógenos específicos ou aqueles que abrigam uma microbiota conhecida (gnotobióticos) para a realização de experimentos. Apesar da constatação da ocorrência concomitante de diferentes organismos no mesmo hospedeiro, influenciando um ao outro, direta ou indiretamente, entomologistas e parasitologistas raramente consideram mais do que o organismo de interesse isoladamente em seus estudos. Outra razão dos estudos de infecção múltipla ainda serem raros é a complexidade desse tipo de interação, que são muitas vezes difíceis de serem entendidas (COX, 2001).

Os insetos estão sujeitos ao desafio de uma diversidade de parasitas e agentes patogênicos (TANADA; KAYA, 1993), com potencial para a exposição simultânea a

várias espécies ou estirpes de patógenos (LECUONA; BERRETA; GRAU, 1996; MALAKAR et al., 1999; ISHII et al., 2002), dessa forma alguns estudos investigaram as interações de patógenos e/ou parasitas em invertebrados (e esta lista não tem a pretensão de ser completa) (BAILEY, 1965, 1968; HURPIN; ROBERT, 1968; LOWE; PASCHKE, 1968a; 1968b; TANADA; HUKUHARA, 1968; BAJAN; KMITOWA, 1972; AOKI, 1974; WHITLOCK, 1977; FERRON, 1978; RITTER; TANADA, 1978; FUXA, 1979; WYSOKI; RACCAH, 1980; BARBERCHECK; KAYA, 1990; ALATORRE-ROSAS; KAYA, 1990; SUTÁKOVÁ; REHÁČEK, 1990; CHANDLER; HEALE; GILLESPIE, 1993; ARNE; NORDIN, 1995; INGLIS et al., 1997; KOPPENHÖFER; KAYA, 1997; BAUER et al., 1998; INGLIS et al., 1999; KOPPENHÖFER et al., 1999; MALAKAR et al., 1999; HACKETT et al., 2000; PERLMAN; JAENIKE, 2001; ISHII et al., 2002; SOLTER et al., 2002; ANSARI; TIRRY; MOENS, 2004; KRAUSS et al., 2004; SHAPIRO-ILAN et al., 2004; MARANGA et al., 2005; WRAIGHT; RAMOS, 2005; RAO; UMA DEVI; KHAN, 2006; RAYMOND; SAYYED; WRIGHT, 2006; ACEVEDO et al., 2007; GIANNOULIS et al., 2007; RAYMOND; DAVIS; BONSALL, 2007; MA et al., 2008; RAYMOND et al., 2008; TOUNOU et al., 2008; GOERTZ; HOCH, 2009; MARZBAN et al., 2009; PUZA; MRÁČEK, 2009).

Hospedeiros representam um recurso limitado, portanto a ocorrência mútua, inevitavelmente resulta em uma competição entre os patógenos (HUGHES; BOOMSMA, 2003). O resultado das interações dos patógenos, muitas vezes é relacionado ao aumento da virulência, entretanto também podem resultar na diminuição da virulência dependendo da dinâmica da doença (MAY; NOVAK, 1995; FRANK, 1996; COX 2001, THOMAS; WATSON; VALVERDE-GARCIA, 2003; HUGHES; BOOMSMA, 2003). Em infecções mistas podem ocorrer interações complexas entre os patógenos envolvidos, assim a capacidade de um ou ambos os agentes infectantes pode ser aumentada, suprimida, ou a capacidade de um patógeno pode ser aumentada enquanto a do outro agente envolvido é suprimida (THOMAS; WATSON; VALVERDE-GARCIA, 2003; COX, 2001).

A natureza da competição intra-hospedeiro pode variar desde aquelas caracterizadas como superinfecções, em que a competição é vencida pelo patógeno mais virulento com a tendência de eliminar os menos virulentos, até coinfecções, onde

os parasitas diferem pouco na virulência e os recursos acabam sendo compartilhados entre os patógenos através de concorrência direta (NOWAK; MAY, 1994; MAY; NOWAK, 1995; HUGHES; BOOMSMA, 2003). Entretanto quando a dinâmica é de superinfecção, nem sempre o patógeno menos virulento é eliminado, pois ele pode conseguir completar o ciclo infectivo exteriorizando os sintomas antes do mais virulento mesmo não sendo o responsável principal pela morte do hospedeiro (HUGHES; BOOMSMA, 2003).

Lopes e Alves (2005) avaliaram a suscetibilidade de duas colônias de *Blatella germanica* (Linnaeus; 1767) (Dictyoptera: Blattellidae), parasitada e não parasitada por *Gregarina* sp, quanto a suscetibilidade a *M. anisopliae* e ao inseticida Alsyntin. Concluíram que os insetos infectados pelo protozoário foram mais suscetíveis ao fungo e ao inseticida, propondo que doenças crônicas podem influenciar os resultados da aplicação deste entomopatógeno e inseticida, superestimando a eficiência destes em populações sadias.

Koppenhöfer e Kaya (1997) estudando a interação de *Bacillus thuringiensis japonensis* e os nematóides *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar; 1975) (Nematoda: Heterorhabditidae), *Steinernema glaseri* (Steiner; 1929) (Nematoda: Steinernematidae) e *S. kushidai* (Mamiya; 1988) (Nematoda: Steinernematidae) em *Cyclocephala hirta* (LeConte; 1861) (Coleoptera: Scarabaeidae) e *C. pasadenae* (Casey; 1915) (Coleoptera: Scarabaeidae), observaram efeito aditivo e sinérgico somente com os dois primeiros nematóides, e não com o último, que se mostrou o mais virulento isoladamente.

Avaliando o efeito da combinação dos nematóides *H. indica* (Poinar, Karunakar & David; 1992), (Nematoda: Rhabditida) e *S. carpocapsae* (Weiser; 1955). (Nematoda: Steinernematidae) com os patógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Isaria fumosorosea* (Wize; 1904) e *Serratia marcescens* (Bizio; 1819), Shapiro-ilan et al. (2004) observaram antagonismo em todas as combinações dos patógenos, exceto na aplicação conjunta de *H. indica* e *M. anisopliae* em que foi observado efeito aditivo.

Wraight e Ramos (2005) observaram sinergismo na aplicação conjunta de *B. bassiana* e *B. thuringiensis tenebrionis* sobre *Leptinotarsa decemlineata* (Say; 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em plantações de batata durante três anos. Rao, Uma

Devi e Khan (2006) submeteram lagartas de segundo ínstar de *Spodoptera litura* a aplicação conjunta de *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) e *B. bassiana* em dois regimes de temperatura, um constante (25° C) e outro variável (32°C/8horas e 21°C/16horas) e concluíram que o tratamento combinado dos dois fungos não resultou em efeito sinérgico na mortalidade de insetos.

No Brasil, *M. anisopliae* é aplicado em pelo menos 600 mil hectares anualmente para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar e nessas áreas os problemas com *D. saccharalis* tendem a ser menores, pois o fungo também atua regulando a população da broca, mesmo não sendo esta a praga alvo da aplicação. Entretanto, os resultados de eficácia do patógeno são variáveis devido a fatores importantes tais como: qualidade do fungo, dosagem aplicada, métodos de aplicação e fatores bióticos e abióticos na ocasião da aplicação (ALVES, 1986). A determinação da eficiência das aplicações do fungo é difícil de ser feita em campo com precisão pelo fato de que encontram-se, comumente, insetos infectados por *M. anisopliae*, *B. bassiana* e menos frequentemente com DsGV. Também ainda não é conhecida a porcentagem de infecção no campo que é devida a eficiência do patógeno aplicado em relação à ocorrência natural do fungo. Estudos foram iniciados com o intuito de desenvolver técnicas de biologia molecular para identificar e caracterizar isolados comerciais do fungo para avaliar o desempenho do patógeno aplicado (MACEDO, 2005; MACEDO; ALVES; VIEIRA, 2006).

Conhecer as possíveis interações dos patógenos que podem atuar na supressão da população da praga alvo, seja pela aplicação massal ou pela ocorrência natural, é de extrema importância para avaliar a dinâmica da doença e epizootiologia em campo. Esse aspecto ganha importância quando o inseto avaliado pode ser infectado naturalmente por diferentes patógenos, pois a eficiência de uma aplicação pode ser superestimada pela atuação de entomopatógenos autóctones, não necessariamente da mesma espécie ou gênero do aplicado.

A atuação de patógenos secundários é difícil de ser quantificada, pois geralmente em infecções múltiplas embora esses atuem conjuntamente levando o hospedeiro a morte, só um dos patógenos consegue completar o ciclo da infecção (RAO; UMA DEVI; KHAN, 2006; INGLIS et al., 1997; 1999), que pode ser detectado

pela esporulação no cadáver no caso dos fungos ou sintomas característicos da morte causada pelos vírus.

Thomas, Watson e Valverde-Garcia (2003) sugeriram que infecções mistas podem contribuir para uma variabilidade inesperada na dinâmica hospedeiro-patógeno ao longo do tempo e/ou do espaço o que em termos de controle biológico poderia resultar em eficácia variável de um agente, dependendo da comunidade microbiana residente.

Considerando que a infecção múltipla é comum em condições de campo e que geralmente apenas um dos patógenos envolvidos consegue completar o processo infectivo no mesmo inseto exteriorizando seu sintoma, é importante avaliar estas interações em sistemas agrícolas onde entomopatógenos são utilizados, principalmente quando o inseto alvo da avaliação é suscetível a diferentes espécies ou mesmo variantes genéticas de uma mesma espécie que ocorrem concomitantemente. Isto poderia ser realizado adotando-se metodologias para determinar a presença e abundância de espécies de entomopatógenos tanto os nativos quanto os utilizados em liberações inundativas e correlacionar essas informações com o impacto destes na regulação das populações de insetos. Isto poderia explicar, por exemplo, a inconsistência dos resultados na eficácia de controle de agentes microbianos em diferentes circunstâncias.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo geral caracterizar as interações resultantes das infecções mistas de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e DsGV sobre *D. saccharalis*. Os objetivos específicos foram:

- Determinar a CL₅₀ e TL₅₀ dos patógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e DsGV aplicados isolada ou conjuntamente sobre *D. saccharalis*;
- Identificar nas aplicações mistas, o patógeno que completa o processo infectivo exteriorizando os sintomas da doença e quantificar o número de propágulos produzidos;
- Determinar através da contagem total de hemócitos as alterações no sistema imune de *D. saccharalis* quando submetidos aos fungos isolada e conjuntamente;

- Comparar a dinâmica das doenças causadas pela infecção múltipla dos fungos através da avaliação direta da densidade de propágulos na hemolinfa do inseto e indiretamente pelo cultivo *in vitro* dos dois fungos em placas contendo meio B.D.A. (batata dextrose agar);
- Determinar a eficiência de pulverizações de forma isolada e concomitante dos patógenos no controle de *D. saccharalis* em plantas de milho;
- Demonstrar a suscetibilidade diferencial de duas populações de *D. saccharalis* e do cruzamento entre elas (F1) aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Referências

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUES, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 187-192, 2007.

ALATORRE-ROSAS, R.; KAYA, H. Interspecific Competition between Entomopathogenic Nematodes in the Genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an Insect Host in Sand. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 179-188, 1990.

ALMEIDA, L.C., ALVES, S.B. Testes preliminares de dosagens do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok para o controle da broca-da-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (F.). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 35-110, 1982.

ALMEIDA, L.C.; BOTELHO, P.S.M.; PAVAN, O.H.O. Avaliação do vírus da granulose para o controle da broca-da-cana-de-açúcar. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba; Manole.1986. cap. 10. p. 203-209.

ALMEIDA, L.C.; ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; PINHEIRO, J.B. Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) de diferentes idades. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 20-27, 1984.

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

_____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.

ALVES, S.B.; STIMAC J.L.; PEREIRA R.M.; VIEIRA, S.A. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. **Biocontrol. Science and Technology**. Oxford, v. 6, p. 575-581, 1996

ALVES, S.B.; ROSSI, L.S.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, p. 70-77, 2002.

ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 172-180, 2004.

AOKI, J. Mixed infection of the gypsy moth, *Lymantria dispar japonica* Motschulsky (Lepidoptera: Lymantriidae), in a larch forest by *Entomophthora aulicae* (Reich.) Sorok. and *Paecilomyces canadensis* (Vuill.) Brown et Smith. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 9, p. 185-190, 1974

ARNE, C.N.; NORDIN, G.L. Enhancement of indices of viral infection by simultaneously administering *Helicoverpa zea* and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses to larval *Helicoverpa zea* (Boddie). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 66, p. 18-24, 1995.

BAILEY, L. Susceptibility of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus, infested with *Acarapis woodi* (Rennie) to infection by airborne pathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 7, p. 141-143, 1965.

_____. The Measurement and Interrelationships of Infections with *Nosema apis* and *Malpighamoeba mellificae* of honey-bee populations. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p.175-179, 1968.

BAJAN, C.; KMITOWA, K. Successive infection. **Ekologia Polska**, Warszawa, v. 20, p. 433-440, 1972.

BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the Entomogenous Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 255-234, 1990.

BAUER, L.S.; MILLER, D.L.; MADDOX, J.V.; MCMANUS, M.L. Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and Nuclear Polyhedrosis Virus Infecting the Gypsy Month, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 147-153, 1998.

BELL, J.V.; HAMALLE, R.J. Comparative mortalities between field-collected and laboratory-reared wireworm larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego. v. 18, p. 150-151, 1971.

BONNING, B.C. Baculoviruses: biology, biochemistry and molecular biology. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. New York: Elsevier Pergamon Press, 2005. v. 6, p. 233-270.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 25, p. 409-421.

BOTELHO, P.S.M., PARRA, J.R.P., CHAGAS-NETO, J.F., OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

BRIESE, D.T. The incidence of parasitism and disease in field populations of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) in Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, Brisbane, v. 20. p. 319-326. 1981

BROTHNELL, D.; SANDISON, A.T. (Ed.). **Diseases in antiquity**. Springfield: C.C. Thomas, 1967. 766 p.

CHANDLER, D.; HEALE, J.B.; GILLESPIE, A.T. Competitive interaction between strains of *Verticillium lecanii* on two insect hosts. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, p. 435-440, 1993.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 23 ago. 2009.

COCKBURN, A.; COCKBURN, E.; REYMAN, T.A. (Ed.). **Mummies, diseases and ancient cultures**. 2nd ed. Cambridge; Cambridge University Press, 1998. 428 p.

COX, F.E.G. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, Cambridge, v. 122, p. S23-S38, 2001.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 23, p. 409-442, 1978.

FRANK, S.A. Models of parasite virulence. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 71, p. 37-78, 1996

FUXA, J.R. Interactions of the Microsporidium *Vairimorpha necatrix* with a Bacterium, Virus and Fungus in *Heliothis zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 33, p. 316-323, 1979.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GIANNOULIS, P.; BROOKS, C.L.; DUNPHY, G.B.; MANDATO, C.A.; NIVEN, D.F.; ZAKARIAN, R.J. Interaction of the bacteria *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) and *Bacillus subtilis* (Bacillaceae) with the hemocytes of larval *Malacosoma disstria* (Insecta: Lepidoptera: Lasiocampidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 94, p.20-30, 2007.

GOERTZ, D.; HOCH, G. Three microsporidian pathogens infectiong *Lymantria dispar* larvae do not differ in their success in horizontal transmission. **Journal Applied Entomology**, Berlin, v. 133, p. 568-570, 2009.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In.: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v.1, chap. 9, p. 177-202.

HACKETT, K.J.; BOORE, A.; DEMING, C.; BUCKLEY, E.; CAMP, M.; SHAPIRO, M. *Helicoverpa armigera* Granulovirus interference with progression of *H. zea* Nucleopolyhedrovirus disease in *H. zea* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 75, p. 99-106, 2000.

HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Biology Letters**, London, v. 271, p. 104-106, 2004.

HUNTER, D.K.; HOFFMANN, D.F. Susceptibility of two strains of Indian meal moth to a granulosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 21, p. 114-115, 1973

HURPIN, B.; ROBERT, P. Experiments on simultaneous infections of the common cockchafer *Melolontha melolontha*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 11, p. 203-213, 1968.

INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; KAWCHUK, L.M.; GOETTEL, M.S. Influence of oscillating oemperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flooviride*. **Biological Control**, Orlando, v. 14, p. 111-120, 1999.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; CHENG, K.J.; GOETTEL, M.S. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. **Biological Control**, Orlando, v. 8, p. 143-152, 1997.

ISHII, T.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; KUNIMI, Y. Growth characteristics and competitive abilities of a nucleopolyhedrovirus and an entomopoxvirus in larvae of the smaller tea tortrix *Adoxophyes bonnai* (Lepidoptera: Tortricidae). **Biological Control**, Orlando, v. 23, p. 96-105, 2002.

KELLER, S.; SCHWEIZER, C.; SHAH, P. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 9, p. 441-446, 1999.

KOPPENHÖFER, A.M.; KAYA, H.K. Additive and synergist interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. **Biological Control**, Orlando, v. 8, p. 131-137, 1997.

KOPPENHÖFER, A.M.; CHOO, H.Y.; KAYA, H.K.; LEE, D.W.; GELERNTER, W.D. Increased Field and Greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. **Biological Control**, Orlando, v. 14, p. 37-44, 1999.

KRAUSS, U.; HIDALGO, E.; ARROYO, C.; PIPER, S.R. Interaction Between the Entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the Mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 331-346, 2004.

LECUONA, R.E.; ALVES, S.B. Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. and granulose virus on *Diatraea saccharalis* (F., 1794) at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**. Berlin, v. 105, p. 223-228, 1988.

LECUONA, R.E.; BERRETA, M.; GRAU, O. Differential features of ten strains of *Beauveria bassiana* isolated from a single adult of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 29., 1996, Cordoba. **Proceedings...** Cordoba: University Cordoba, 1996. p. 47.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B. Effect of *Gregarina* sp. parasitism on the susceptibility of *Blattella germanica* to some control agents. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, p. 261-264, 2005.

LOWE, R.E.; PASCHKE, J.D. Simultaneous Infection with the Nucleopolyhedrosis and Granulosis Viruses of *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 86-92, 1968.

_____. Pathology of a double viral infection of *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 438-443, 1968.

MA, X.; LIU, X.; NING, X.; ZHANG, B.; HAN, F.; GUAN, X.; TAN, Y.; ZHANG, Q. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin CRY1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, 123-128, 2008.

MACEDO, D. **Seleção e Caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar.** 2005. 104 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MACEDO, D. ; ALVES, S.B. ; VIEIRA, S.A. . Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, p. 47-52, 2006.

MALAKAR, R.; ELKINTON, J.S.; HAJEK, A.E.; BURAND, J.P. Within-Host Interactions of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis Virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycets: Entomophthorales). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, p. 91-100, 1999.

MARANGA, R.O.; KAAYA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 159, p. 527-532, 2005.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B.; MARQUES, I.M.R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 303-307, 2000

MARZBAN, R.; HE, Q.; LIU, X.; ZHANG, Q. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 101, 71-76, 2009.

MAY, R.M.; NOWAK, M.A. Coinfection and the evolution of parasite virulence. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences**, London, v. B206, p. 209-215, 1995

MILNER, R.I. On the occurrence of pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. resistant to isolates of the fungal pathogen *Erynia neoaphidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 32, p. 23-27, 1982

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 44, p. 257-289, 1999.

MURPHY, F.A.C., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, A.W., JARVIS, A.W., MARTELLY, G., MAYO, M.E., SUMMERS, D. (Ed.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, New York, suppl. 10, p. 1-586; 1995.

NOWAK, M.A., MAY, R.M. Superinfection and the evolution of virulence. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences**, London, v. B255, p. 81-89, 1994.

OSSOWSKI, L.L.J. Variation in virulence of a wattle bagworm virus. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 2, p. 35-43, 1960.

PAPIEROK, B.; WILDING, N. Mise en evidence d'une difference de sensibilite entre 2 clones du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* Harr. (Homopteres: Aphididae), expose à 2 souches du champignon Phycomycete *Entomophthora obscura* Hall & Dunn. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**. Ser. D., Paris v. 288, p. 93-95, 1979

PAVAN. O.H.O.; RODRIGUES, E.P.; VERONS, S.K.; ALMEIDA, L.C. Vírus da granulose de *Diatraea saccharalis*: efeito de dose e idade do hospedeiro na mortalidade das lagartas de broca-da-cana, *D. saccharalis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., 1983, Brasília. **Resumos...** Brasília: SEB, 1983a. p. 260.

PAVAN, O.H.O., BOUCIAS, D.G., ALMEIDA, L.C., GASPAR, J.O., BOTELHO, P.S.M., DEGASPARI, N. Granulosis virus of *Diatraea saccharalis* (DsGV): Pathogenicity, replication and ultrastructure. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE ISSCT, 8., Havana, 1983. **Proceedings...** Havana: ISSCT, 1983b. 22, p.644-659.

PERLMAN, S.J.; JAENIKE, J. Competitive interactions and persistence of two nematode species that parasitize *Drosophila recens*. **Ecology Letters**, Oxford, v.4, p. 577-584, 2001.

PUZA, V.; MRÁČEK, Z. Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema kraussei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 102, p. 40-43, 2009.

RAO, C.U.M.; UMA DEVI, H.; KHAN, P.A.A. Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* (Hypocerales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, p. 221-232, 2006.

RAYMOND, B.; DAVIS, D.; BONSALL, M.B. Competition and reproduction in mixed infections of pathogenic and non-pathogenic *Bacillus* spp. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 151-155, 2007.

RAYMOND, B.; SAYYED, A.H.; WRIGHT, D.J. The compatibility of a nucleopolyhedrosis virus control with resistance management for *Bacillus thuringiensis*: Co-infection and cross-resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 93, p. 114-120, 2006.

RAYMOND, B.; LIJEK, R.S.; GRIFFITHS, R.I.; BONSALL, M.B. Ecological consequences of ingestion of *Bacillus cereus* on *Bacillus thuringiensis* infections and on the gut flora of a lepidopteran host. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, p. 103-111, 2008.

READ, A.F.; TAYLOR, L.H. The ecology of genetically diverse infections. **Science**. Washington, v. 292, p. 1099-1102, 2001

RITTER, K.S.; TANADA, Y. Interference between two nuclear polyhedrosis viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipunctata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomophaga**, Paris, v. 23, p. 349-359, 1978.

ROTHENBUHLER, W.C.; THOMPSON, V.C. Resistance to American foulbrood in honeybees. I. Differential survival of larvae of different genetic lines. **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 49, p. 470-475, 1956

SHAPIRO-ILAN, D.; JACKSON, M.; REILLY, C.C.; HOTCHKISS, M.W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 119-126, 2004.

SOLTER, L.F.; SIEGEL, J.P.; PILARSKA, D.K.; HIGGS, M.C. The impact of mixed infection of three species of microsporidia isolated from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, p. 103-113, 2002.

STEINHAUS, E. A., MARSH, G. A. Report diagnoses of diseased insects. **Hilgardia**, Berkeley, v. 33, n. 9, p. 349-490, 1962.

SUTÁKOVÁ, G.; REHÁČEK, J. Mixed Infection of *Rickettsiella phytoseiuli* and *Coxiella burnetti* in *Dermacentor reticulatus* Female Ticks: Electron Microscope Study. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 407-416, 1990.

TANADA, Y.; HUKUHARA. A nonsynergistic strain of a Granulosis Virus of the armyworm *Pseudaleia unipuncta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 263-268, 1968.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. 666 p.

THOMAS, M.B.; WATSON, E.L.; VALVERDE-GARCIA, P. Mixed infections and insect-pathogen interactions. **Ecology Letters**, Oxford, v. 6, p. 183-188, 2003.

TOUNOU, A.K.; KOOYMAN, C.; DOURO-KPINDOU, O.D.; POEHLING, H.M. Combined field efficacy of *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for the control of sahelian grasshoppers. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 53, p. 813-828, 2008.

UMA DEVI, K.; PADMAVATHI, J.; RAO, C.V.M.; KHUAN, A.A.P.; MURALI, C. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, p. 975-989, 2008.

WATANABE, H. The host population. In: FUXA, J.R.; TANADA, Y. (Ed.) **Epizootiology of insect diseases**. San Diego: Wiley-Interscience. 1987. chap. 4, p. 71-112.

WHITLOCK, V.H. Simultaneous Treatments of *Heliothis armigera* with a Nuclear Polyhedrosis and a Granulosis Virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 29, p. 297-303, 1977.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 90, p. 139-150, 2005.

WYSOKI, M.; RACCAH, B. A Synergistic Effect of two pathogenic bacteria from the enterobacteriaceae on the gemetrid *Boarmia selenaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 35, p. 209-210, 1980.

2 INTERAÇÃO DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS DE *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE): *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) E GRANULOVÍRUS

Resumo

Os efeitos de aplicações isoladas de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e vírus da granulose e de combinações destes patógenos sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* foram avaliados em laboratório. As combinações de *M. anisopliae* + DsGV; *M. anisopliae* + *B. bassiana* e *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV resultaram em efeito aditivo na mortalidade de lagartas, enquanto foi observado efeito antagônico na mistura de *B. bassiana* e DsGV. Todos os cadáveres oriundos das aplicações associadas apresentaram sintomas de apenas um dos patógenos envolvidos na infecção. A produção de conídios de uma espécie de fungo nos cadáveres submetidos à co-infecção foi semelhante à produção de conídios da mesma espécie na infecção isolada. Porém, quando *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram cultivados conjuntamente *in vitro*, observou-se uma drástica redução na produção de conídios em comparação aos cultivos isolados, com produção 22,8 e 5,7 vezes menor em co-cultivo quando comparado à produção isolada por *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente. Na interação dos fungos *in vivo* ficou evidente que os patógenos se desenvolvem concomitantemente durante a maior parte do processo infectivo, e que a exclusão de um dos patógenos ocorre tardiamente, próxima ao momento da reprodução dos fungos. A infecção por *B. bassiana* resultou em redução na densidade de hemócitos circulantes na hemolinfa de lagartas, entretanto esse efeito não foi observado nas lagartas inoculadas com *M. anisopliae*. Os patógenos isolados e suas combinações foram eficientes na diminuição do número de lagartas recuperadas vivas e consequentemente nos danos por elas causados em bioensaio realizado sobre plantas de milho. Dessa forma, exceto a mistura de *B. bassiana* e DsGV, todas as outras combinações dos patógenos têm potencial para uso no controle de *Diatraea saccharalis*.

Palavras-chave: Controle associado; Infecção mista; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Vírus da granulose; Efeito aditivo; Antagonismo; *Diatraea saccharalis*; Cana-de-açúcar

INTERACTION OF THE MAIN PATHOGENS OF *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae): *Metarhizium anisopliae* (Metsch), *Beauveria bassiana* (Bals.) AND GRANULOVIRUS

Abstract

Effects of individual applications of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and granulovirus and of combinations of these pathogens on *Diatraea saccharalis* larvae were evaluated in laboratory. Combinations of *M. anisopliae* + DsGV, *M. anisopliae* + *B.*

bassiana and *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV resulted in an additive effect to larvae mortality, while it was observed an antagonistic effect from the association of *B. bassiana* and DsGV. All dead caterpillars derived from mixed infections presented symptoms of only one of the pathogens. Conidial production of a fungus species in dead caterpillars submitted to co-infection was similar to the conidial production of the same species in individual infection. However, when *M. anisopliae* and *B. bassiana* were cultivated concomitantly *in vitro*, it was observed a drastic reduction in the conidial production compared to individual cultivations. Production of conidia was 22.8 and 5.7 times smaller in co-cultivation compared to the production in single inoculation by *M. anisopliae* and *B. bassiana*, respectively. As for the interactions of fungi *in vivo*, it was evident that the pathogens developed concomitantly during most part of the infective process, and that the exclusion of one of the pathogens is likely to occur close to the moment of fungi reproduction. Infection by *B. Bassiana* resulted in drastic reduction of hemocyte density on caterpillar hemolymph; however, this effect was not observed with the inoculation of *M. anisopliae*. Treatments with a single pathogen or combinations of pathogens were efficient in reducing the number of caterpillars recovered alive and therefore on the damages caused by them in the bioassay carried out on corn plants. Thus, except for the mix of *B. bassiana* and DsGV, all other combinations of pathogens have potential to be used in the control of *Diatraea saccharalis*.

Keywords: Associated control; Mixed infection; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Granulovirus; Additive effect; Antagonism; *Diatraea saccharalis*; Sugarcane

2.1 Introdução

Na natureza, infecções concomitantes de patógenos e/ou parasitas em um mesmo hospedeiro invertebrado são a regra (READ; TAYLOR, 2001; COX 2001) e podem resultar em diferentes tipos de interações (BAILEY, 1965, 1968; HURPIN; ROBERT, 1968; LOWE; PASCHKE, 1968a; 1968b; TANADA; HUKUHARA, 1968; BAJAN; KMITOWA, 1972; AOKI, 1974; WHITLOCK, 1977; FERRON, 1978; RITTER; TANADA, 1978; FUXA, 1979; WYSOKI; RACCAH, 1980; BARBERCHECK; KAYA, 1990; ALATORRE-ROSAS; KAYA, 1990; SUTÁKOVÁ; REHÁČEK, 1990; CHANDLER; HEALE; GILLESPIE, 1993; ARNE; NORDIN, 1995; INGLIS et al. 1997; KOPPENHÖFER; KAYA, 1997; BAUER et al., 1998; INGLIS et al., 1999; KOPPENHÖFER et al., 1999; MALAKAR et al., 1999; HACKETT et al., 2000;

PERLMAN; JAENIKE, 2001; ISHII et al. 2002; SOLTER et al., 2002; ANSARI; TIRRY; MOENS, 2004; KRAUSS et al., 2004; SHAPIRO-ILAN et al., 2004; MARANGA et al., 2005; WRAIGHT; RAMOS, 2005; RAO; UMA DEVI; KHAN, 2006; RAYMOND; SAYYED; WRIGHT, 2006; ACEVEDO et al., 2007; GIANNOULIS et al., 2007; RAYMOND; DAVIS; BONSALL, 2007; MA et al., 2008; RAYMOND et al., 2008; TOUNOU et al., 2008; GOERTZ; HOCH, 2009; MARZBAN et al., 2009; PUZA; MRÁČEK, 2009).

Hospedeiros representam um recurso limitado, portanto a ocorrência mútua, inevitavelmente resulta em uma competição entre os patógenos (HUGHES; BOOMSMA, 2003). Geralmente em infecções mistas somente um dos patógenos consegue concluir o processo infectivo no mesmo hospedeiro, exteriorizando seu sintoma (RAO; UMA DEVI; KHAN, 2006; INGLIS et al., 1997, 1999), dessa forma muitas vezes esse tipo de interação não é reconhecida e a morte do hospedeiro é relacionada a ação isolada do patógeno que concluiu a infecção. Patógenos podem interagir de duas formas em infecções múltiplas, na primeira delas existe a tendência de eliminação do menos virulento (superinfecção), na segunda os patógenos tendem a coexistir (coinfecção) concorrendo diretamente pelos recursos do hospedeiro, essa ocorre quando a virulência dos patógenos é semelhante. O resultado das interações dos patógenos, muitas vezes é relacionado ao aumento da virulência, entretanto também podem resultar na diminuição da virulência dependendo da dinâmica da doença (NOVAK; MAY, 1994; MAY; NOVAK, 1995; FRANK, 1996; COX 2001, THOMAS; WATSON; VALVERDE-GARCIA, 2003; HUGHES; BOOMSMA, 2003).

A broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep: Crambidae) destaca-se como a praga de maior importância da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Esse inseto é naturalmente infectado por diversos patógenos, sendo os mais frequentes em condições de campo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae), chegando a atingir 10% dos insetos em algumas regiões do Brasil (ALVES; LOPES, 2008), e vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* (DsGV). Esses patógenos ocorrem concomitantemente no espaço e tempo, sugerindo que muito provavelmente ocorra a

interação deles em populações de *D. saccharalis* (ALVES, 1986; LECUONA; ALVES, 1988).

O objetivo do presente trabalho foi determinar o resultado das infecções concomitantes de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e DsGV sobre *Diatraea saccharalis*, por meio de parâmetros como mortalidade, concentração letal, tempo letal e produção de propágulos. A dinâmica do processo infectivo bem como mudanças no sistema imune (quantidade total de hemócitos) foi avaliada em lagartas desafiadas pelos fungos isolada e conjuntamente.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Insetos

A população de *Diatraea saccharalis* foi obtida junto ao C.C.A. (Centro de Ciências Agrárias) da Universidade Federal de São Carlos e mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP desde 2009. As lagartas (5 por tubo) foram mantidas em tubos de vidro contendo aproximadamente 10 mL de dieta artificial de Hensley, Hammond (1968) em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase. As pupas e os adultos foram mantidos em gaiolas em sala de criação, sendo que para os adultos ofereceu-se apenas água. As condições da sala de criação apesar de monitoradas, não foram controladas, permanecendo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase. As lagartas destinadas aos testes de virulência foram provenientes da segunda postura, e neste caso foram colocadas 15 lagartas em cada tubo de dieta.

2.2.2 Fungos

Os fungos *B. bassiana* (ESALQ-PL63), isolado de *Atta* sp. (Hymenoptera: Formicidae) em Piracicaba-SP e *M. anisopliae* (ESALQ-1037) isolado de *Solenopsis* sp. (Hymenoptera: Formicidae) em Porto Alegre-RS, foram obtidos do banco de entomopatógenos do laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ-USP.

Os conídios de cada um dos fungos utilizados nos bioensaios foram produzidos em placas de Petri contendo meio B.D.A. (Difco®). As placas foram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase), durante 10 dias, até

que ocorresse a conidiogênese. Após o período de incubação os conídios foram raspados das placas e transferidos para 15mL de água estéril contendo espalhante adesivo (0,01% de Tween[®] 80), e após a quantificação em câmara de Neubauer foram preparadas suspensões nas concentrações 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹. A partir dessas, foram elaboradas as suspensões da mistura de *M. anisopliae* + *B. bassiana* nas cinco concentrações citadas anteriormente. Nas suspensões em que os fungos foram misturados cada patógeno representou exatamente metade do número total de conídios.

A viabilidade dos conídios foi determinada, inoculando-se 0,1mL das duas suspensões iniciais em placas de Petri contendo meio B.D.A., essas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase) durante 24 horas e a proporção de conídios viáveis foi verificada ao microscópio de luz. Os fungos apresentaram viabilidade superior a 95%.

2.2.3 Vírus

Para desinfestação externa das lagartas infectadas por DsGV estas foram lavadas durante 5 minutos em solução de 5% hipoclorito de sódio e 0,05% streptomycina, em seguida passando-se por água estéril durante 2 minutos por 3 vezes. Posteriormente, os insetos foram macerados em cadinho com auxílio de um pistilo na presença de solução-tampão Tris (pH 7,4) + 0,1% SLS (lauril sulfato de sódio), 0,5mL por lagarta e após a homogeneização das larvas a suspensão foi filtrada em tecido “voile” para a retirada do excesso de resíduos orgânico do inseto. A suspensão viral foi transferida para um tubo de centrifuga ao volume de 10mL.

Em seguida, essa suspensão foi centrifugada (Sorvall RT 6000) durante 2 minutos a 335,8 g (= 1.500 rpm) e temperatura de 4°C. O precipitado foi descartado centrifugando-se o sobrenadante durante 30 minutos a 5373 g (= 6500 rpm) à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspendido em água destilada resultando em uma suspensão semi-purificada de vírus que foi armazenada. A quantificação da suspensão inicial do vírus foi realizada em câmara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Pensilvânia, EUA), em microscópio de luz no

aumento de 1000 vezes em imersão. A suspensão foi quantificada cinco vezes e a média das repetições foi utilizada como valor final da concentração da suspensão que totalizou 2×10^{10} OB.mL⁻¹. Essa suspensão foi preservada em freezer (- 40°C) constituindo a fonte de inóculo para a realização dos experimentos.

2.2.4 Virulência dos patógenos isolados e em mistura

Devido ao elevado número de tratamentos a virulência dos patógenos foi determinada de forma isolada e nas diferentes combinações das espécies de patógenos por meio de dois bioensaios. No primeiro bioensaio foram avaliadas as aplicações do DsGV isolado e das combinações DsGV + *M. anisopliae*; DsGV + *B. bassiana* e DsGV + *M. anisopliae* + *B. bassiana*. No Segundo bioensaio avaliou-se a inoculação dos fungos isoladamente (*M. anisopliae* e *B. bassiana*) e da combinação (*M. anisopliae* + *B. bassiana*). Os ensaios foram mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase) e durante as avaliações diárias as lagartas mortas foram transferidas para câmara úmida com o intuito de verificar qual dos patógenos conseguiu completar o ciclo infectivo, exteriorizando os sintomas. Nesse bioensaio a produção de propágulos não foi quantificada.

2.2.4.1 Virulência de DsGV, DsGV + *M. anisopliae*, DsGV + *B. bassiana* e DsGV + *M. anisopliae* + *B. bassiana*.

O bioensaio conteve 20 tratamentos com 5 repetições de 10 lagartas cada uma, além da testemunha composta de água estéril + espalhante adesivo (0,01% de Tween[®] 80), totalizando 1050 lagartas. Os tratamentos consistiram na aplicação de cinco concentrações dos patógenos (10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 e 10^9 propágulos.mL⁻¹) isoladamente ou em combinações. Quando mais de um patógeno foi aplicado conjuntamente, a concentração total foi igual àquelas usadas nas aplicações isoladas. Por exemplo, no tratamento DsGV + *M. anisopliae* na concentração 10^7 a concentração viral foi de 5×10^6 OB.mL⁻¹ e a fúngica de 5×10^6 conídios.mL⁻¹, já no tratamento DsGV +

M. anisopliae + *B. bassiana* na concentração 10^9 , cada patógeno foi utilizado na concentração de $3,33 \times 10^8$ OB ou conídios.mL⁻¹.

Foram cortados discos (0,5 x 0,5cm) de dieta modificada de Hensley e Hammond (1968) isenta de formol e metilparahidroxibenzoato (Nipagin) com aproximadamente 0,16 grama. Em uma placa de Petri, foi colocado 10mL de água estéril e nas outras 20 placas foram transferidas suspensões do DsGV nas concentrações $3,33 \times 10^6$; 5×10^6 (2 placas); 10^7 ; $1,66 \times 10^7$; $2,5 \times 10^7$ (2 placas); $3,33 \times 10^7$; 5×10^7 (3 placas); 10^8 ; $1,66 \times 10^8$; $2,5 \times 10^8$ (2 placas); $3,33 \times 10^8$; 5×10^8 (3 placas) e 10^9 OB.mL⁻¹. Nessas placas foram imersos 10 discos de dieta durante 10 minutos, posteriormente os discos foram retirados e transferidos para placas secas, essas alocadas em câmara de fluxo laminar para secagem do excesso de líquido. Após a secagem, os discos de dieta foram transferidos para placas de bioensaio (1,5cm de altura e 6cm de diâmetro) em duplicatas onde foram colocadas 10 lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis*, previamente lavadas em água destilada para retirada do excesso de dieta em que estavam sendo criadas. Desta forma, para cada concentração foram utilizadas 5 placas com 10 lagartas, totalizando 50 lagartas por tratamento.

Decorridas 36 horas as lagartas foram transferidas para a tampa da placa de acrílico, as cinco repetições (tampas) foram dispostas conjuntamente em uma placa de Petri (1,5cm de altura e 15cm de diâmetro) e pulverizadas em torre de Potter (15 lb/pol²), com 2,5 mL da suspensão correspondente a cada tratamento (Tabela 1). No controle foi utilizado água estéril + espalhante adesivo (0,01% de Tween[®] 80). As 10 lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis*, permaneceram por 1 minuto na placa antes de serem transferidas para outra placa idêntica e limpa, contendo porções de dieta para a alimentação. As avaliações foram realizadas diariamente e o alimento trocado após cada avaliação.

2.2.4.2 Virulência de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* + *B. bassiana*.

O bioensaio foi dividido em 16 tratamentos com 5 repetições de 10 lagartas cada, totalizando 800 lagartas. Os tratamentos consistiram na aplicação de diferentes concentrações dos fungos isolados mais a aplicação dos dois fungos conjuntamente.

No controle foi aplicado água estéril + espalhante adesivo (0,01% de Tween[®] 80). A metodologia do experimento foi semelhante ao descrito no item anterior.

2.2.5 Co-cultivo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* *in vitro*

Este bioensaio foi conduzido para avaliar o desenvolvimento de *M. anisopliae* e *B. bassiana in vitro*, para tentar elucidar questões levantadas sobre o processo de infecção concomitante dos dois patógenos *in vivo*. Para tanto, 0,1mL das suspensões de cada patógeno foi inoculado com o auxílio de um micropipetador no centro da placa e espalhado com alça de Driglasky com 4 repetições por tratamento.

As suspensões de *M. anisopliae*; *B. bassiana* e *M. anisopliae* + *B. bassiana* foram inoculadas nas concentrações de 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ em placas de Petri (1,5cm de altura e 6cm de diâmetro) plásticas e estéreis contendo 10 mL de meio de cultura B.D.A. (Difco®), totalizando 15 tratamentos. Após a inoculação as placas foram dispostas em câmara climatizada do tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase) permanecendo nessas condições por 10 dias, tempo necessário para ocorrer a conidiogênese. Para quantificar a produção de conídios nas placas, foram transferidos 5mL de água estéril + espalhante adesivo (0,02% de Tween[®] 80) para as placas e a superfície do meio de cultura foi raspada com o auxílio de um bastão com ponta de borracha para a retirada efetiva dos conídios. A suspensão de conídios da placa foi transferida para um tubo de vidro contendo 5 mL de água estéril + espalhante adesivo, posteriormente os tubos foram agitados por 1 minuto em vortex e mantidos em ultrassom por 5 minutos para a homogeneização da suspensão. As suspensões foram então diluídas sucessivamente e quantificadas em câmara de Neubauer e microscópio de luz no aumento de 400 vezes. Dessa forma, obteve-se a quantidade de conídios produzida por placa pelos dois fungos.

Tabela 1 - Tratamentos realizados nos bioensaios de virulência de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* (DsGV) através da pulverização de lagartas de *D. saccharalis* ou inoculação da dieta artificial

Tratamento	Pulverização		Inoculação da Dieta		
	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	^a H ₂ O	DsGV	H ₂ O
^b <i>M. anisopliae</i>	10 ⁷	^e ---	---	---	^f S
	5×10 ⁷	---	---	---	S
	10 ⁸	---	---	---	S
	5×10 ⁸	---	---	---	S
	10 ⁹	---	---	---	S
^c <i>B. bassiana</i>	---	10 ⁷	---	---	S
	---	5×10 ⁷	---	---	S
	---	10 ⁸	---	---	S
	---	5×10 ⁸	---	---	S
	---	10 ⁹	---	---	S
<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i>	5×10 ⁶	5×10 ⁶	---	---	S
	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	---	---	S
	5×10 ⁷	5×10 ⁷	---	---	S
	2,5×10 ⁸	2,5×10 ⁸	---	---	S
	5×10 ⁸	5×10 ⁸	---	---	S
Testemunha	---	---	S	---	S
^d DsGV	---	---	S	10 ⁷	---
	---	---	S	5×10 ⁷	---
	---	---	S	10 ⁸	---
	---	---	S	5×10 ⁸	---
	---	---	S	10 ⁹	---
<i>M. anisopliae</i> + DsGV	5×10 ⁶	---	---	5×10 ⁶	---
	2,5×10 ⁷	---	---	2,5×10 ⁷	---
	5×10 ⁷	---	---	5×10 ⁷	---
	2,5×10 ⁸	---	---	2,5×10 ⁸	---
	5×10 ⁸	---	---	5×10 ⁸	---
<i>B. bassiana</i> + DsGV	---	5×10 ⁶	---	5×10 ⁶	---
	---	2,5×10 ⁷	---	2,5×10 ⁷	---
	---	5×10 ⁷	---	5×10 ⁷	---
	---	2,5×10 ⁸	---	2,5×10 ⁸	---
	---	5×10 ⁸	---	5×10 ⁸	---
<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i> + DsGV	3,33×10 ⁶	3,33×10 ⁶	---	3,33×10 ⁶	---
	1,66×10 ⁷	1,66×10 ⁷	---	1,66×10 ⁷	---
	3,33×10 ⁷	3,33×10 ⁷	---	3,33×10 ⁷	---
	1,66×10 ⁸	1,66×10 ⁸	---	1,66×10 ⁸	---
	3,33×10 ⁸	3,33×10 ⁸	---	3,33×10 ⁸	---

^a Água estéril + espalhante adesivo (0,01% Tween[®] 80). ^b *Metarhizium anisopliae*. ^c *Beauveria bassiana*. ^d Vírus da granulose de *Diatraea saccharalis*. ^e Patógeno não inoculado. ^f Aplicação de água.

2.2.6 Co-infecção de *M. anisopliae* e *B. bassiana* in vivo

Suspensões de 5×10^8 conídios.mL⁻¹ de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e da mistura dos dois fungos, além do controle composto por água estéril mais espalhante adesivo, foram inoculadas em lagartas de 5º instar (não foram utilizadas lagartas de 3º instar como nos experimentos anteriores devido ao tamanho diminuto destas o que dificultou a coleta da hemolinfa para análise). Foram utilizadas 5 repetições contendo 10 lagartas cada por tratamento. As lagartas foram inoculadas com 3µL da suspensão, por meio de uma seringa de vidro acoplada a um microaplicador automático (Microaplicador Bukard Manufacturing Co. Ltd). Após a inoculação as lagartas foram transferidas em grupos de 10 para placas de bioensaio, contendo discos de dieta, e mantidas em estufa incubadora B.O.D. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 12 horas fotofase).

As avaliações foram realizadas 48, 65, 72, 89, 96, 113 e 120 horas após a inoculação e para cada tempo foram separadas aleatoriamente três lagartas de cada tratamento. Os insetos foram anestesiados em geladeira por 5 minutos e posteriormente com o auxílio de uma pequena tesoura foi realizada uma incisão em uma das falsas pernas coletando-se 8µL de hemolinfa com um micropipetador. Em tubos eppendorf contendo 195µL de solução tampão anticoagulante (0.098 M NaOH, 0.186 M NaCl, 0.017 M EDTA, 0.041 M ácido cítrico) (MEAD; RATCLIFFE; RENWRANTZ, 1986) foram dispostos 5µL de hemolinfa, para quantificação dos hemócitos em câmara de Neubauer, e os 3µL de hemolinfa restantes foram diluídos em tubo eppendorf contendo 297µL de solução salina, plaqueando-se 2,5; 5,0; 10; e 100µL dessa suspensão em placas com meio B.D.A. (Difco®) para quantificar o número de blastósporos.

A contagem total de hemócitos foi realizada em microscópio de luz no aumento de 400 vezes e o número de blastósporos foi determinado quantificando-se as U.F.C. (Unidades Formadoras de Colônias) decorridos três dias de incubação das placas em B.O.D. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 12 horas fotofase).

As lagartas mortas foram pesadas e mantidas em câmara úmida. Após a conidiogênese foi quantificado o número de conídios produzidos por miligrama de lagarta. Essa etapa foi realizada para comparar a produção de conídios das lagartas

que receberam os fungos isoladamente com os insetos inoculados com a combinação dos patógenos. O ensaio foi repetido uma vez, e a média dos experimentos foi utilizada nas análises estatísticas.

2.2.7 Virulência de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e DsGV a *Diatraea saccharalis* em plantas de milho aplicados isoladamente ou em misturas

Plantas de milho com aproximadamente 1,5 m de altura cultivadas em vasos de sete litros contendo substrato foram infestadas com 10 lagartas de 2º ínstar de *D. saccharalis* próximas a bainha das folhas. Após 2 minutos as plantas foram pulverizadas com 10mL de suspensões dos patógenos com um pulverizador elétrico modelo “airbrush set” (30mL.min⁻¹) (Primar Ltda., modelo 141, 2 CV). Foram utilizadas suspensões de *M. anisopliae*; *B. bassiana* e DsGV na concentração de 5×10^8 conídios ou OB.mL⁻¹. O ensaio consistiu de 8 tratamentos com 8 repetições de 10 lagartas. Os tratamentos foram: *M. anisopliae*; *B. bassiana*; DsGV; *M. anisopliae* + *B. bassiana*; *M. anisopliae* + DsGV; *B. bassiana* + DsGV e *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV além da testemunha, pulverizada com água estéril + espalhante adesivo. A pulverização foi realizada sobre toda a superfície da planta de forma homogênea. Nas suspensões com mais de um patógeno, o volume de calda da somatória dos patógenos correspondeu ao volume da suspensão dos patógenos isolados, ou seja, 5 mL da suspensão de cada patógeno quando dois foram usados conjuntamente e 3,33 mL da suspensão de cada um deles quando os 3 foram misturados. As plantas foram mantidas em sala climatizada, a $26 \pm 3^\circ \text{C}$, $63 \pm 5\%$ UR e 12 horas de fotofase. A avaliação ocorreu após 12 dias da aplicação, contabilizando-se o número de orifícios encontrados na planta (profundidade $\geq 0,2\text{cm}$) e lagartas recuperadas vivas.

2.2.8 Análises estatísticas

A relação entre mortalidade e concentração dos patógenos, em tratamentos isolados ou associados, foi descrita pelo modelo logístico de distribuição binomial. Este

modelo pode ser descrito da seguinte forma: $y = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha + \beta \log(x))}}$, onde x , α e β são

concentração do patógeno, intercepto e coeficiente angular (*slope*), respectivamente. A seleção deste modelo baseou-se no valor de *deviance* (razão de χ^2 Pearson pelo grau de liberdade do experimento) e no teste da “razão do log-verossimilhança”, comparados com outros modelos, tais como complemento log-log e probit. Dessa forma, as concentrações e tempos letais (CL₅₀, CL₉₀, TL₅₀ e TL₉₀) com seus respectivos intervalos de confiança foram estimados usando o procedimento PROBIT do programa SAS 9.1.3, e comparados entre si por dois métodos, a saber: teste da “razão da concentração letal” ou PR “potência relativa” (ROBERTSON; PREISLER, 1992) para concentrações letais e método da sobreposição de intervalos de confiança para os tempos letais (os valores de TL₅₀ e TL₉₀ não são significativamente diferentes entre si quando seus respectivos IC95% se sobrepõem). Quando necessário, considerou-se o fator de heterogeneidade no cálculo das concentrações letais e seus respectivos intervalos de confiança para conjuntos de dados com valor de χ^2 Pearson significativo, que indica superdispersão dos dados (*deviance* > 1) (COLLETT, 1991). Para avaliar o tipo de interação que ocorreu na combinação de patógenos foi utilizado o modelo proposto por Tabashnik

(1992), este modelo utiliza a fórmula $LD_{50(m)} = \left[\frac{r_a}{LD_{50(a)}} + \frac{r_b}{LD_{50(b)}} + \frac{r_c}{LD_{50(c)}} \right]$, onde r_a

é a proporção relativa do patógeno “a”, LD_{50(a)} é a concentração ou dose letal do patógeno “a” e LD_{50(m)} é a concentração ou dose letal esperada para a mistura dos patógenos, para estimar a CL₅₀ ou CL₉₀ esperada na mistura de patógenos. O valor é então contrastado com a CL₅₀ ou CL₉₀ observada e respectivo IC95%. Se o valor esperado estiver incluído no IC95% a interação é considerada aditiva, já se o valor for maior que o limite superior do IC95% a interação é considerada sinérgica. Da mesma forma quando o valor esperado da CL₅₀ for menor que o limite inferior do IC95% conclui-se que os patógenos se antagonizam.

Os dados dos outros experimentos foram submetidos à análise de variâncias e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). O teste T ($p \leq 0,05$) foi utilizado nos ensaios *in vitro* e *in vivo* em que os dois fungos foram aplicados concomitantemente para comparar a proporção de estruturas de cada um deles.

Os dados foram transformados para atender as exigências de homocedasticidade, dessa forma os dados de mortalidade larval nos experimentos de virulência foram transformados em $\arcseno\sqrt{\frac{x}{100}}$, nos ensaios da interação *in vitro* e *in vivo* foram transformados em $\log(x+1)$ e no bioensaio de virulência sobre plantas de milho os dados referentes ao número de lagartas recuperadas transformados em $(x + 0,5)^{-1}$ enquanto os dados de número de orifícios em $\sqrt{x + 0,5}$. Todas as análises foram conduzidas usando o programa estatístico SAS 9.13 (SAS INSTITUTE, 1999).

2.3 Resultados

2.3.1 Virulência dos Patógenos isolados e em mistura

Não houve mortalidade nas testemunhas dos dois ensaios durante os 14 dias de avaliação. Os gráficos de superfície de resposta (Figura 1) relacionando a concentração-tempo-mortalidade foram eficientes para demonstrar a tendência com que cada tratamento afetou o hospedeiro ficando evidente o aumento da mortalidade com o aumento do tempo de exposição e da concentração. A avaliação da virulência, determinada através das concentrações e tempos letais pelo modelo logístico e pela comparação de médias confirmou as tendências demonstradas pelos gráficos em três dimensões.

A tendência de aumento de mortalidade com o aumento das concentrações também pode ser verificada nas curvas sigmóides descritas pelo modelo logístico, em que a mortalidade foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações, sendo que todos os tratamentos apresentaram slope significativo ($p < 0,05$) variando de $0,92 \pm 0,21$ a $1,44 \pm 0,26$ (Figura 2). Entretanto, alguns tratamentos apresentaram maiores mortalidades em concentrações mais baixas como *M. anisopliae* + *B. bassiana* (*M.a.+B.b.*), *B. bassiana* (*B.b.*), *M. anisopliae* + DsGV (*M.a.+DsGV*) e DsGV ao contrário dos tratamentos *M. anisopliae* (*M.a.*), *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV (*M.a.+B.b.+DsGV*) e *B. bassiana* + DsGV (*B.b.+DsGV*) que apresentaram níveis menores de mortalidade nas duas concentrações mais baixas. Nas maiores concentrações todos os tratamentos apresentaram tendência de aumento de

mortalidade de forma mais rápida, porém nos tratamentos compostos apenas pelos fungos as curvas foram mais acentuadas, com destaque para *M. anisopliae* na maior concentração. Os tratamentos que continham o DsGV apresentaram mortalidade tardia quando comparados aos outros tratamentos (Figura 1).

Baseado no teste de razão entre as concentrações letais, os valores de CL_{50} e CL_{90} dos patógenos isolados e em mistura não foram significativamente diferentes entre si, em virtude de os valores dos IC95% das Potências Relativas terem incluído o número 1 ($p > 0,05$), com exceção do tratamento *M.a.+B.b.* que diferiu do tratamento *B.b.+DsGV* em relação a CL_{50} . Dessa forma está apresentado na tabela apenas o teste de razão entre as concentrações em que o tratamento *M.a.+B.b.* foi considerado o valor padrão de comparação (Tabela 2). Não foi detectado sinergismo nos tratamentos em que os patógenos foram combinados. Nas misturas *M.a.+B.b.*; *M.a.+DsGV* e *M.a.+B.b.+DsGV* ocorreu um efeito aditivo entre os patógenos, já que as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) esperadas estavam inclusas nos respectivos IC95% das concentrações letais observadas. No tratamento *M.a.+B.b.* a CL_{50} observada ($9,48 \times 10^6$) foi menor do que a CL_{50} esperada ($2,21 \times 10^7$). O mesmo foi obtido para *M.a.+DsGV* com a CL_{50} observada e esperada de $1,97 \times 10^7$ e $3,12 \times 10^7$, respectivamente. Na combinação de *B. bassiana* com DsGV foi observado um efeito antagônico entre os microrganismos já que as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) esperadas, $1,7 \times 10^7$ e $1,56 \times 10^9$, respectivamente, foram menores que os limites inferiores dos IC95% das concentrações letais observadas (Tabela 2).

Na menor concentração (10^7) somente o tratamento *M.a.+B.b.* atingiu 50% de mortalidade não sendo possível calcular o tempo letal (TL_{50}) para os outros tratamentos nesta concentração. Na concentração seguinte (5×10^7 propágulos.mL⁻¹) os tratamentos mais rápidos foram *B.b.* (9,9 dias, 9,1 - 10,8) e *M.a.+B.b.* (9,0 dias, 8,1 - 10,2) ambos diferindo de *M.a.+DsGV* com 11,3 dias (10,5 - 12,3) (Tabela 3)

Na concentração 10^8 propágulos.mL⁻¹ os tratamentos isentos de vírus não foram estatisticamente diferentes (*M.a.*; *B.b.*; e *M.a.+B.b.*), entretanto esse grupo diferiu dos tratamentos com a presença do DsGV (DsGV; *M.a.+DsGV*; *B.b.+DsGV* e *M.a.+B.b.+DsGV*). Nessa concentração, o menor TL_{50} foi observado em *M.a.* (6,5 dias, 5,4 - 7,7) e o maior em *M.a.+DsGV* (11,6 dias, 10,9; 12,6). Com 5×10^8 propágulos.mL⁻¹ os

tratamentos mais lentos foram DsGV e *B.b.*+DsGV com 11,0 dias (10,4 - 11,5) e 10,6 (9,9 - 11,3) respectivamente. A combinação *M.a.*+DsGV apresentou TL₅₀ intermediário de 9,2 dias (8,5 - 10,0) e os tratamentos mais rápidos foram *M.a.*; *B.b.*; *M.a.*+*B.b.* e *M.a.*+*B.b.*+DsGV com tempos letais de 6,2 (5,6 - 6,8), 7,0 (6,2 - 7,9), 6,9 (6,3 - 7,6) e 7,4 dias (6,5 - 8,5), respectivamente. Na maior concentração, a menor TL₅₀ ocorreu em *M.a.* com 3,7 dias (3,2 - 4,2), em seguida não diferiram *B.b.* (5,3 dias, 4,7 - 6,0) e *M.a.*+*B.b.* (5,7 dias, 5,1 - 6,2), e destacaram-se como os tratamentos mais lentos DsGV e *B.b.*+DsGV apresentando TL₅₀ de 8,8 (8,4 - 9,3) e 9,0 dias (8,3 - 9,9), respectivamente.

O TL₉₀ foi estimado somente para os tratamentos *M.a.*; *B.b.*; *M.a.*+*B.b.* e DsGV na maior concentração (10⁹), pois só esses tratamentos mataram mais de 90% das lagartas. O TL₉₀ dos tratamentos compostos somente pelos fungos não diferiram entre si apresentando sobreposição de IC95%, mas estes valores foram inferiores ao tratamento DsGV que apresentou TL₉₀ de 13,6 dias (12,7 - 14,8) (Tabela 3).

Nas três maiores concentrações (10⁸, 5×10⁸ e 10⁹ propágulos.mL⁻¹) não foram observadas diferenças estatísticas nas porcentagens médias de mortalidade entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 4). As duas testemunhas foram iguais, portanto somente uma está representada na tabela. Na concentração 10⁸ propágulos.mL⁻¹ a mortalidade variou de 72 ± 8,6% no tratamento *B.b.* a 54 ± 5,1%, no tratamento *M.a.*+DsGV. Na concentração 5×10⁸, a mortalidade em todos os tratamentos foi superior a 60% e na maior concentração testada todos os tratamentos causaram mais de 78% de mortalidade. Na concentração 10⁷ propágulos.mL⁻¹ ($F_{7, 39} = 21,01$, $p < 0,001$) a maior mortalidade ocorreu na mistura dos dois fungos (54 ± 6,8%) que não diferiu estatisticamente dos tratamentos *B.b.*; DsGV e *M.a.*+ DsGV, e o tratamento menos efetivo foi *B.b.*+DsGV (12 ± 3,7%) e *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV. Com 5×10⁷ propágulos.mL⁻¹ ($F_{7, 39} = 16,75$, $p < 0,001$) os tratamentos mais eficientes foram *B.b.*; DsGV; *M.a.*+*B.b.* e *M.a.*+DsGV, e os menos eficientes foram *M.a.*+*B.b.*+DsGV; *M.a.*; DsGV e *B.b.*+DsGV.

Todas as lagartas mortas nos tratamentos onde mais de dos microrganismos foram aplicados conjuntamente apresentaram sintoma de apenas um dos patógenos envolvidos na infecção, ou seja, em nenhum caso mais de um patógeno completou a

infecção no mesmo inseto. Em todos os tratamentos combinados a percentagem dos insetos mortos que não apresentou sintomatologia característica de um dos patógenos inoculados variou de 3% (*M.a.*+DsGV) a 15% (*B.b.*+DsGV) das lagartas mortas. No tratamento *M.a.*+*B.b.*, 69% dos insetos apresentaram sinais de infecção por *B. bassiana* contra 22% de *M. anisopliae*, sendo que a maior proporção de *B. bassiana* foi mais evidente na maior e menor concentração (10^7 e 10^9). No tratamento *M.a.*+DsGV em praticamente metade dos insetos a mortalidade foi confirmada por *M. anisopliae* e outra metade por DsGV, entretanto observou-se uma tendência de maiores porcentagens de lagartas mortas com sintomas da virose nas três concentrações menores enquanto o fungo apareceu mais nas duas maiores concentrações (Figura 3).

No tratamento concomitante de *B. bassiana* e DsGV, 59% dos insetos apresentaram sintoma de infecção viral contra 26% de lagartas com sintomas fúngicos, e em todas as concentrações o vírus prevaleceu sobre o fungo. Dos insetos que receberam a aplicação dos três patógenos (*M.a.*+*B.b.*+DsGV), 52% apresentaram sintomas do vírus, 28% de *M. anisopliae* e 15% de *B. bassiana*, sendo essa tendência praticamente constante em todas as concentrações, com exceção da maior concentração em que os dois fungos apresentaram a mesma proporção de confirmação.

Nos tratamentos que receberam os microrganismos isolados praticamente todos os cadáveres confirmaram a infecção pelo patógeno inoculado com 99, 100 e 97% de confirmação para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e DsGV, respectivamente.

Figura 1 - Gráficos de superfície de resposta demonstrando a relação concentração-tempo-mortalidade entre ao patógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e granulovírus DsGV aplicados isolada e conjuntamente sobre lagartas de 3º instar de *Diatraea saccharalis*

Figura 2 - Relação concentração-mortalidade entre patógenos e hospedeiro descrita pelo modelo logístico. Virulência dos patógenos isolados e das possíveis combinações a lagartas de 3º instar de *Diatraea saccharalis*. IC = Intervalo de confiança 95%

Tabela 2 - Parâmetros usados no modelo logístico, estimativas das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) e potências de razão e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) para a relação entre concentração dos patógenos e mortalidade. Cálculo das concentrações letais esperadas (CL₅₀ e CL₉₀) para a combinação dos patógenos

Tratamento	GL	^A χ^2 (p)	CL ₅₀ Observada (IC95%)	CL ₉₀ Observada (IC95%)	^B PR – CL ₅₀ (IC95%)	^B PR – CL ₉₀ (IC95%)	^C CL ₅₀ Esperada	^C CL ₉₀ Esperada
<i>M. anisopliae</i>	23	28,3740 (0,20)	$4,81 \times 10^7$ ($1,31 \times 10^7$; $1,08 \times 10^8$)	$1,6 \times 10^9$ ($6,9 \times 10^8$; $6,33 \times 10^9$)	0,19 ^{ns} (0,033; 1,17)	0,83 ^{ns} (0,14; 4,92)	x	x
<i>B. bassiana</i>	22	34,8808* (0,039)	$1,43 \times 10^7$ ($4,64 \times 10^5$; $6,02 \times 10^7$)	$1,13 \times 10^9$ ($2,78 \times 10^8$; $2,98 \times 10^{10}$)	0,66 ^{ns} (0,07; 6,61)	1,17 ^{ns} (0,12; 11,01)	x	x
DsGV	23	21,5738 (0,54)	$2,31 \times 10^7$ ($3,7 \times 10^6$; $6,5 \times 10^7$)	$2,49 \times 10^9$ ($7,95 \times 10^8$; $2,30 \times 10^{10}$)	0,41 (0,06; 2,92)	0,53 ^{ns} (0,07; 4,23)	x	x
<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i>	23	30,5391 (0,13)	$9,48 \times 10^6$ ($8,7 \times 10^5$; $3,08 \times 10^7$)	$1,33 \times 10^9$ ($4,17 \times 10^8$; $1,35 \times 10^{10}$)	1 (0,22; 4,51)	1 (0,23; 4,36)	$2,21 \times 10^7$ Aditivo	$1,33 \times 10^9$ Aditivo
<i>M. anisopliae</i> + DsGV	23	27,3292 (0,24)	$1,97 \times 10^7$ ($1,7 \times 10^6$; $6,87 \times 10^7$)	$4,8 \times 10^9$ ($1,15 \times 10^9$; $1,13 \times 10^{11}$)	0,48 ^{ns} (0,06; 4,17)	0,27 ^{ns} (0,03; 3,03)	$3,12 \times 10^7$ Aditivo	$1,95 \times 10^9$ Aditivo
<i>B. bassiana</i> + DsGV	23	27,5206 (0,23)	$7,77 \times 10^7$ ($2,52 \times 10^7$; $1,87 \times 10^8$)	$4,92 \times 10^9$ ($1,57 \times 10^9$; $3,67 \times 10^{10}$)	0,12* (0,02; 0,72)	0,27 ^{ns} (0,03; 2,09)	$1,70 \times 10^7$ Antagonismo	$1,56 \times 10^9$ Antagonismo
<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i> + DsGV	23	29,4762 (0,16)	$8,14 \times 10^7$ ($2,87 \times 10^6$; $2,77 \times 10^8$)	$3,11 \times 10^9$ ($1,17 \times 10^9$; $1,91 \times 10^{10}$)	0,11 ^{ns} (0,01; 1,13)	0,42 ^{ns} (0,07; 2,72)	$2,27 \times 10^7$ Aditivo	$1,59 \times 10^9$ Aditivo

^A Valores de χ^2 de Pearson para o teste do modelo logístico. ^B PR = potência relativa; quando o IC95% incluir o número 1 para PR de CL₅₀ ou CL₉₀, então os valores não são significativamente diferentes (ns = não significativo, $p > 0,05$) o padrão de comparação foi o tratamento *M. anisopliae* + *B. bassiana*. IC = intervalo de confiança. ^C CL₅₀ ou CL₉₀ esperada = concentração letal para matar 50% ou 90% dos indivíduos, calculada segundo modelo proposto por TABASHNIK (1992). * significativo ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Tempos letais (TL₅₀ e TL₉₀) estimados pelo modelo logístico e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) para a relação entre tempo e mortalidade

Tratamento		TL ₅₀ (IC95%)	TL ₉₀ (IC95%)	^A χ ²	<i>p</i>
Patógeno	Conc.				
^b M.a.	10 ⁸	6,5 (5,4; 7,7)	----	141,10	<0,0001
	5×10 ⁸	6,2 (5,6; 6,8)	----	73,31	0,2787
	10 ⁹	3,7 (3,2; 4,2)	8,7 (7,4; 10,6)	102,96	0,0031
^c B.b.	5×10 ⁷	9,9 (9,1; 10,8)	----	123,68	<0,0001
	10 ⁸	7,6 (6,8; 8,4)	----	120,01	<0,0001
	5×10 ⁸	7,0 (6,2; 7,9)	----	190,28	<0,0001
	10 ⁹	5,3 (4,7; 6,0)	10,0 (8,6; 12,2)	152,76	<0,0001
M.a. + B.b.	10 ⁷	9,6 (8,9; 10,5)	----	91,33	0,0258
	5×10 ⁷	9,0 (8,1; 10,2)	----	134,76	<0,0001
	10 ⁸	7,1 (6,3; 8,1)	----	101,97	0,0038
	5×10 ⁸	6,9 (6,3; 7,6)	----	80,18	0,1296
	10 ⁹	5,7 (5,1; 6,2)	8, (7,92; 10,3)	169,61	<0,0001
^d DsGV	10 ⁸	10,0 (9,3; 10,7)	----	98,47	0,0074
	5×10 ⁸	11,0 (10,4; 11,5)	----	43,45	0,9886
	10 ⁹	8,8 (8,4; 9,3)	13,6 (12,7; 14,8)	64,99	0,5468
M.a. + DsGV	5×10 ⁷	11,3 (10,5; 12,3)	----	68,48	0,4267
	10 ⁸	11,6 (10,9; 12,6)	----	76,93	0,1904
	5×10 ⁸	9,2 (8,5; 10,0)	----	63,58	0,5957
	10 ⁹	7,4 (6,7; 8,2)	----	217,60	<0,0001
B.b. + DsGV	10 ⁸	10,9 (10,2; 11,7)	----	110,97	0,0006
	5×10 ⁸	10,6 (9,9; 11,3)	----	94,46	0,0152
	10 ⁹	9,0 (8,3; 9,9)	----	86,70	0,0531
M.a. + B.b. + DsGV	10 ⁸	10,2 (9,4; 11,3)	----	85,88	0,0599
	5×10 ⁸	7,4 (6,5; 8,5)	----	150,36	<0,0001
	10 ⁹	7,4 (6,8; 7,9)	----	115,41	0,0002

Tratamentos que apresentaram χ² significativo (p < 0,05) tiveram o fator de heterogeneidade (FH) multiplicado as variâncias e covariâncias a fim de acomodar a superdispersão ^A valores de χ² de Pearson para o teste do modelo Logístico. ^b *Metarhizium anisopliae*. ^c *Beauveria bassiana*. ^d Vírus da granulose de *Diatraea saccharalis*.

Tabela 4 - Porcentagem média ($\pm$ EPM) de mortalidade de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* após aplicação de diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, granulovírus (DsGV). Os patógenos foram aplicados isoladamente ou em misturas

Tratamento	Concentração					CV (F;p)
	10^7	5×10^7	10^8	5×10^8	10^9	
<i>M. anisopliae</i>	28 $\pm$ 4.9 Cbc	36 $\pm$ 6,8 Cc	70 $\pm$ 8,9 Ba	72 $\pm$ 3,7 Ba	94 $\pm$ 4,0 Aa	12,3 (F _{5,29} =48,22. p<0,001)
<i>B. bassiana</i>	46 $\pm$ 4,0 Ca	66 $\pm$ 7,5 BCa	72 $\pm$ 8,6 BCa	78 $\pm$ 9.7 ABa	90 $\pm$ 7.7 Aa	15,6 (F _{5,29} =24,52. p<0,001)
DsGV	42 $\pm$ 3.7 Dab	48 $\pm$ 5.8 CDabc	62 $\pm$ 6.6 BCa	70 $\pm$ 3.2 Ba	94 $\pm$ 4.0 Aa	10,1 (F _{5,29} =61,98. p<0,001)
<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i>	54 $\pm$ 6.8 Ca	58 $\pm$ 9.2 Cab	64 $\pm$ 6.0 BCa	82 $\pm$ 5.8 Ba	94 $\pm$ 4.0 Aa	12,1 (F _{5,29} =41,22. p<0,001)
<i>M. anisopliae</i> + DsGV	46 $\pm$ 7.5 Ba	54 $\pm$ 6.8 Babc	54 $\pm$ 5.1 Ba	80 $\pm$ 5.5 Aa	84 $\pm$ 8.1 Aa	13,8 (F _{5,29} =29,77. p<0,001)
<i>B. bassiana</i> + DsGV	12 $\pm$ 3.7 Cd	44 $\pm$ 7.5 Bbc	56 $\pm$ 7.5 Ba	60 $\pm$ 7.1 Ba	78 $\pm$ 4.9 Aa	13,3 (F _{5,29} =35,42. p<0,001)
<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i> + DsGV	22 $\pm$ 5.8 Bcd	34 $\pm$ 6.8 Bc	62 $\pm$ 5.8 Aa	72 $\pm$ 10.2 Aa	82 $\pm$ 5.8 Aa	16,7 (F _{5,29} =23,43. p<0,001)
Testemunha	0 $\pm$ 0 Ae	0 $\pm$ 0 Ad	0 $\pm$ 0 Ab	0 $\pm$ 0 Ab	0 $\pm$ 0 Ab	
CV (F;p)	12,9 (F _{7,39} =21,01. p<0,001)	13,7 (F _{7,39} =16,75. p<0,001)	12,1 (F _{7,39} =22,12. p<0,001)	13,6 (F _{7,39} =19,48. p<0,001)	13,8 (F _{7,39} =21,92. p<0,001)	

Médias ($\pm$ EPM) seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e letras minúsculas nas colunas não diferem significativamente (Duncan, p > 0,05).

Figura 3 - Número de lagartas de 3º instar de *Diatraea saccharalis* mortas com sintomas ou sinais do patógeno que concluiu o processo infectivo, quando submetidas à inoculação das possíveis combinações de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e DsGV. Gráfico de pizza mostra a porcentagem de confirmação de cada patógeno envolvido na infecção

2.3.2 Co-cultivo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* *in vitro*

A concentração da suspensão inoculada no meio de cultura teve efeito significativo na produção de conídios (Figura 4). Nos tratamentos em que *M. anisopliae* foi inoculado sozinho, ocorreu maior produção de conídios nas placas onde foram inoculadas as duas suspensões mais concentradas ($F_{4, 19} = 5,62$, $p = 0,0057$). A concentração da suspensão inoculada não teve efeito na esporulação de *B. bassiana* exceto pela menor produção de conídios na concentração de 5×10^8 . A quantidade de conídios produzida por *B. bassiana* foi em média quatro vezes maior do que por *M. anisopliae*.

Quando os dois fungos foram inoculados conjuntamente numa mesma placa, a produção de conídios foi muito inferior aos valores observados quando os fungos foram plaqueados isoladamente ($F_{14, 59} = 350,48$, $p < 0,0001$) e a produção foi significativamente maior nas menores concentrações ($F_{4, 19} = 10,69$, $p = 0,0003$). Em todas as concentrações das suspensões de *M. anisopliae* + *B. bassiana* a produção de *M. anisopliae* foi muito superior a de *B. bassiana* ($p < 0,0001$), sendo que a quantidade de conídios de *M. anisopliae* produzidos correspondeu em média a 97,7% do total.

2.3.3. Co-infecção de *M. anisopliae* e *B. bassiana* *in vivo*

Nas amostras de hemolinfa coletadas das lagartas 48 horas após a inoculação por *M. anisopliae* e *B. bassiana* e plaqueadas em meio de cultura não foi observado crescimento de colônias de nenhum dos fungos (Figura 5 A). A partir de 65 horas foram observadas colônias em todos os tratamentos com exceção da testemunha. Mesmo não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$) é possível observar que em alguns insetos, *M. anisopliae* apresentou um desenvolvimento de forma mais rápida mesmo após 65 horas. Essa tendência é observada até 96 horas após a inoculação. As maiores densidades de propágulos dos dois fungos ocorreram após 113 e 120 horas, havendo uma tendência das maiores concentrações de *M. anisopliae* ocorrerem antes das maiores concentrações de *B. bassiana*.

A influência dos patógenos na quantidade de hemócitos encontrados por microlitro de hemolinfa de *D. saccharalis* está demonstrada na Figura 5 B. A partir de 65 e 89 horas da inoculação é possível observar que em alguns tratamentos com fungo as

lagartas apresentam densidades de hemócitos menores do que no controle sem fungo ($F_{3, 23} = 3,53$, $p = 0,033$). Após 96 horas e até 120 horas da inoculação é significativa a diminuição da quantidade de hemócitos nas lagartas pulverizadas com *B. bassiana* em comparação com o controle e com *M. anisopliae*. As densidades de hemócitos nas lagartas que receberam a aplicação dos dois fungos conjuntamente não foram estatisticamente diferentes das densidades nas lagartas tratadas com *B. bassiana* isoladamente após 48, 89, 96 e 120 horas e somente diferiram da densidade das lagartas do tratamento com *M. anisopliae* 96 horas após a inoculação ($F_{3, 23} = 11,42$, $p < 0,0001$).

Das colônias formadas pelo tratamento dos patógenos misturados a proporção de *M. anisopliae* foi significativamente maior que *B. bassiana* 65 horas ($F_{1, 9} = 11,54$, $p = 0,0094$) e 72 horas ($F_{1, 9} = 638,13$, $p < 0,0001$) após a inoculação (Figura 5 C). Nas avaliações feitas 89, 96 e 113 horas após a inoculação não houve diferença estatística entre a proporção dos dois fungos ($p > 0,05$), entretanto na última avaliação feita 120 horas após a aplicação todas as colônias eram de *B. bassiana* ($p < 0,0001$).

Não foram observadas diferenças estatísticas na produção de conídios por miligrama de lagarta que foram pulverizadas com os fungos isoladamente ou simultaneamente. A produção de conídios de *M. anisopliae* nas lagartas que foram inoculadas com *M. anisopliae* isoladamente e naquelas que foram inoculadas com os dois fungos, mas que somente ocorreu esporulação de *M. anisopliae* foi de $0,93 \pm 0,06 \times 10^7$ conídios.mg⁻¹ e $1,07 \pm 0,07 \times 10^7$ conídios.mg⁻¹, respectivamente ($F_{1, 18} = 2,01$, $p = 0,1741$). No caso de *B. bassiana* os insetos inoculados somente com esse fungo produziram $6,24 \pm 0,39 \times 10^7$ conídios.mg⁻¹, enquanto que as lagartas provenientes do tratamento combinado e que confirmaram a mortalidade por esse fungo produziram $5,8 \pm 0,42 \times 10^7$ conídios.mg⁻¹ ($F_{1, 14} = 0,35$, $p = 0,565$) (Figura 5 D).

Figura 4 - Produção média de conídios ($\pm$ EPM) de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em placas de Petri contendo meio B.D.A. após a inoculação de 0,1 mL de uma suspensão dos fungos isolados ou da combinação dos patógenos em diferentes concentrações. Médias acompanhadas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente (Duncan, $p > 0,05$). * Diferença significativa na proporção de cada um dos patógenos (Teste T, $p < 0,05$)

Figura 5- Progressão do número de propágulos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e densidade de hemócitos na hemolinfa de lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis* após aplicação isolada ou combinada dos fungos. (A) Médias ($\pm$ EPM) de colônias. μL^{-1} de hemolinfa de lagartas. (B) Total de hemócitos. μL^{-1} de hemolinfa. (A e B) Médias acompanhadas pelas mesmas letras no mesmo intervalo após a aplicação não diferem entre si significativamente (Duncan, $p > 0,05$). (C) Porcentagem de colônias de cada um dos fungos resultantes da aplicação associada dos patógenos. * Diferença significativa na proporção de cada um dos patógenos (Teste T, $p < 0,05$). (D) Número de conídios produzidos em lagartas infectadas pelos fungos isolados, comparado com as lagartas inoculadas com a mistura que confirmaram infecção por cada um dos fungos

2.3.4 Virulência de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e DsGV a *Diatraea saccharalis* em plantas de milho aplicados isoladamente ou em misturas

O número de lagartas recuperadas vivas ($F_{7, 63} = 18,7$, $p < 0,0001$) e número de orifícios ($F_{7, 63} = 13,27$, $p < 0,0001$) de entrada nas plantas de milho foram maiores no controle do que em todos os tratamentos com os patógenos aplicados isoladamente ou em misturas (Figura 6). O tratamento com *B. bassiana* apresentou um número de lagartas recuperadas semelhante ao tratamento com granulovírus e superior a todos os outros tratamentos. Com relação ao número de orifícios, o tratamento com *B. bassiana* diferiu apenas do tratamento com os 3 patógenos aplicados simultaneamente, além da testemunha. O número de orifícios encontrados foi positivamente influenciado pelo número de lagartas encontradas vivas (Spearman, $r = 0,73$, $n = 64$, $p < 0,0001$).

Figura 6 – Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas recuperadas vivas e número de orifícios em plantas de milho, após infestação artificial com 10 lagartas de *Diatraea saccharalis* de segundo ínstar e aplicação de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e DsGV isoladamente e em misturas. Médias do número de lagartas ou do número de orifícios acompanhadas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si (Duncan, $p > 0,05$)

2.4 Discussão

As combinações *M. anisopliae*+*B. bassiana*, *M. anisopliae*+DsGV e *M. anisopliae*+*B. bassiana*+DsGV apresentaram efeito aditivo, enquanto ficou evidenciado antagonismo entre *B. bassiana* e DsGV. Em nenhuma combinação foi observado efeito sinérgico. Geralmente a ausência de sinergismo é mais comum em tratamentos combinados que utilizam a mesma concentração de propágulos dos tratamentos isolados, ou seja, a mistura contém metade da concentração de cada patógeno, como foi conduzido no presente estudo. Rao, Uma Devi e Khan; (2006), Wang et al. (2002) e Leal-Bertioli et al. (2000) também não observaram efeito sinérgico em misturas de entomopatógenos e discutem que em infecções mistas o tempo para levar o inseto a morte pode ser aumentado em função da dose do isolado mais efetivo ser diluída devido a aplicação conjunta. Efeitos aditivos e sinérgicos entre patógenos podem estar relacionados à ordem da infecção e a concentração utilizada de cada patógeno (KOPPENHÖFER; KAYA, 1997; MALAKAR et al., 1999; WRAIGHT; RAMOS, 2005).

O antagonismo entre *B. bassiana* e DsGV encontrado nesse estudo não corrobora com os resultados encontrados por Lecuona e Alves (1988) que em testes de laboratório envolvendo a aplicação dos fungos *B. bassiana*, *B. brongniartii* e vírus da granulose (DsGV) isolados e a combinação dos fungos com o vírus, comprovaram a melhoria na eficiência dos fungos, não alterando a eficiência do vírus. Entretanto as concentrações fúngicas utilizadas foram de 10^8 conídios.ml⁻¹ e a viral de 10^6 OB.mL⁻¹, sendo que, na associação dos patógenos as concentrações foram somadas, diferente desse estudo em que a concentração da mistura foi semelhante a dos patógenos isolados, essa diferença de metodologia pode ser responsável pela discrepância nos resultados.

Em todos os tratamentos combinados apenas um dos patógenos colonizou o cadáver do inseto e nunca mais de um patógeno conseguiu exteriorizar os sintomas no mesmo cadáver. De forma similar a maioria dos estudos demonstra que em infecções mistas apenas um dos patógenos envolvidos domina o processo infectivo (RAO, UMA DEVI, KHAN; 2006; INGLIS et al., 1997, 1999; WANG et al., 2002; LEAL-BERTIOLI et al., 2000; GUZMÁN-FRANCO et al., 2009; HUGHES, BOOMSMA, 2003). O tratamento em que foi observado antagonismo (*B. bassiana* + DsGV) foi o que apresentou o maior

número de cadáveres sem colonização pelos patógenos (15%), esse fato pode estar relacionado a competição intra-hospedeiro ou mesmo pelo antagonismo entre os microrganismos já que nas inoculações dos patógenos isoladamente praticamente todos os insetos mortos apresentaram sintomas de infecção. Esse fato também foi constatado por Rao, Uma Devi, Khan; (2006) em aplicações conjuntas de *B. bassiana* e *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera litura*.

Entender a natureza do impacto causado por cada um dos patógenos no sistema imune do hospedeiro é fundamental para entender a dinâmica da interação (HUGHES, BOOMSMA, 2003). No presente trabalho, foi demonstrado que lagartas de *D. saccharalis* sofreram considerável redução do número total de hemócitos circulantes na hemolinfa quando infectadas por *B. bassiana*, o que não ocorreu nas lagartas infectadas por *M. anisopliae* que só diferiu do tratamento controle em um dos períodos da avaliação. Esses dois fungos durante o processo infectivo produzem toxinas extremamente efetivas na inibição da resposta imune de diferentes insetos (HUXHAM et al., 1989; HUNG et al., 1993; BOUCIAS, PENDLAND, 1998; HUGHES, BOOMSMA, 2003), corroborando com os resultados encontrados para *B. bassiana*, entretanto esse efeito negativo na resposta imune não foi detectado nesse estudo para *M. anisopliae*. O efeito de *B. bassiana* debilitando o sistema imune de *D. saccharalis* pode ser um dos fatores que determinaram o efeito aditivo no tratamento conjunto dos fungos, pois em infecções conjuntas em que um dos patógenos tenha efeito imunodepressor a progressão da doença pode ser facilitada. Thomas, Watson e Valverde-Garcia (2003) discutiram que o efeito sinérgico de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Orthoptera: Acrididae) pode ter sido resultado de uma interação interespecífica como a produção de metabólitos tóxicos por *B. bassiana* que atuaram na redução da defesa celular do hospedeiro o que indiretamente aumentou o desempenho de *M. anisopliae*. Um efeito similar foi reportado na infecção concomitante de *Aspergillus flavus* e *M. anisopliae* sobre *Acromyrmex echinatio* (Forel, 1899) (Hymenoptera: Formicidae) em que a mistura dos patógenos aumentou a eficiência de *A. flavus* provavelmente em função do efeito negativo de *M. anisopliae* sobre o sistema imune do hospedeiro (HUGHES, BOOMSMA, 2003).

O efeito imunodepressor de *B. bassiana* pode explicar os resultados encontrados na associação dos fungos com o vírus. Um dos mecanismos de disseminação intra-hospedeiro dos baculovírus é a infecção de hemócitos, pois como células circulantes na hemolinfa facilitam o processo de infecção entre diferentes tecidos. Inclusive os vírus podem conter genes com função anti-apoptótica, inibindo a morte celular programada, uma das estratégias de defesa do hospedeiro contra infecções virais (WASHBURN et al., 2000; TRUDEAU; WASBURN; VOLKMAN, 2001). Assim, na associação de *B. bassiana* e DsGV o efeito do fungo no sistema imune celular do hospedeiro diminuindo drasticamente a quantidade de hemócitos circulantes pode ter acarretado em efeito negativo na progressão da infecção do DsGV, podendo ser um dos fatores que determinaram o antagonismo entre os patógenos. Como não foi evidenciado efeito negativo de *M. anisopliae* na resposta imune celular de *D. saccharalis*, a progressão da infecção viral não foi afetada o que pode ter resultado no efeito aditivo entre os patógenos na infecção mista.

Mesmo não sendo estatisticamente diferente, observou-se uma tendência de *M. anisopliae* iniciar o processo infectivo com a liberação de blastósporos na hemolinfa antes de *B. bassiana*. Maiores densidades de blastósporos de *B. bassiana* foram observados mais tardiamente. No tratamento combinado a dinâmica da infecção seguiu a tendência dos tratamentos isolados, já que *M. anisopliae* foi mais abundante nos primeiros dois períodos de avaliação, não sendo observadas diferenças nos intervalos intermediários e no último período só foram identificadas colônias de *B. bassiana*. Essa dinâmica ficou evidente no ensaio de virulência que apresentou uma maior prevalência de *B. bassiana* (69%) nos cadáveres, sendo que a maior parte dos insetos (90,9%) morreu após o quinto dia da inoculação quando provavelmente existia uma maior proporção de blastósporos desse fungo na hemolinfa dos insetos. Inglis et al. (1999) estudando a infecção de *B. bassiana* e *M. flavoviridae* sobre *Melanoplus sanguinipes* (Fabr., 1798) (Orthoptera: acrididae) observaram efeito contrário, com *B. bassiana* se desenvolvendo mais rápido que *M. flavoviridae* nos tratamentos isolados. Na mistura dos patógenos a quantidade de blastósporos de *B. bassiana* na hemolinfa foi substancialmente maior que a de *M. flavoviridae*, o que resultou na esporulação por *B. bassiana* em 100% dos cadáveres.

Não foi possível determinar em que fase do processo infectivo o patógeno que confirma a infecção exclui o outro patógeno, entretanto ficou evidente que os fungos atuam conjuntamente no hospedeiro e que a exclusão ocorre somente no final do processo, já que estruturas dos dois fungos foram isoladas da hemolinfa do inseto durante quase todos os períodos avaliados. Além disso, não foi possível comparar a dinâmica dos blastósporos e a colonização (esporulação) no mesmo indivíduo, pois foram utilizadas amostragens destrutivas dos insetos. Inglis et al. (1999) citam a hipótese de que esses fungos são saprófitos relativamente fracos e a evolução para o estado de parasitas permitiu o acesso a hemocele como colonizadores pioneiros e que através da produção de metabólitos secundários eles são capazes de competitivamente excluir outros fungos e bactérias.

Os fungos se antagonizaram quando inoculados conjuntamente *in vitro*, com uma produção de conídios 22,8 e 5,7 vezes menor quando relacionados à produção isolada por *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente. Entretanto, a relação *in vitro* não foi útil para explicar as observações da interação *in vivo* assim como observado por Inglis et al., 1999; Rao, Uma Devi, Khan; 2006. Além disso, não houve diferença estatística na produção de conídios de uma espécie de fungo nos cadáveres submetidos à infecção múltipla quando comparado à produção de conídios da mesma espécie na infecção isolada. Esse aspecto é interessante, pois os dois fungos apresentam mecanismos semelhantes de ação, competindo pelos mesmos recursos nutricionais oferecidos pelo hospedeiro e ambos se desenvolvem conjuntamente durante a maior parte do processo infectivo. Mesmo assim essa competição não refletiu negativamente na produção de propágulos. Uma hipótese que pode explicar esse fato é que o inseto apresenta recursos nutricionais em quantidades superiores ao que o patógeno necessita para completar o processo infectivo e reproduzir. Dessa forma mesmo havendo competição entre os fungos por nutrientes a quantidade de recursos é suficiente para a reprodução do patógeno que consegue completar a infecção, explicando o fato da produção de conídios ter sido igual nas lagartas expostas a infecção simples e mista. Outra hipótese, é que a reprodução do patógeno apresenta como principal fator limitante a disponibilidade de espaço (superfície externa ou volume) disponibilizado pelo hospedeiro. Resultados similares foram encontrados por Hughes et

al. (2004) que demonstraram que a infecção concomitante por diferentes strains de *M. anisopliae* não influenciou a quantidade de conídios produzidos em relação a infecção de cada isolado individualmente em cadáveres de *Acromyrmex echinator*.

Em todos os tratamentos combinados ocorreu a dinâmica de co-infecção, já que mesmo com algumas diferenças nas proporções de confirmação cada um dos patógenos envolvidos concluiu o processo infectivo (confirmação) em pelo menos 15% dos insetos mortos. O tratamento que mais caracterizou a co-infecção foi a mistura de *M. anisopliae* e DsGV em que cada um dos patógenos exteriorizou seu sintoma em praticamente metade dos cadáveres.

Uma das limitações do uso de entomopatógenos como agentes de controle microbiano é que cada espécie ou isolado é normalmente eficaz em uma estreita faixa de condições climáticas, essa limitação poderia ser parcialmente resolvida, na teoria, através da co-formulação de patógenos com diferentes intervalos de tolerância ecológica (RAO, UMA DEVI, KHAN; 2006). Os tratamentos com os patógenos isolados e suas combinações foram efetivos na diminuição do número de lagartas recuperadas vivas e conseqüentemente nos danos por elas provocados, demonstrando que mesmo em condições menos controladas de temperatura e umidade e sobre dieta natural (milho) não houve diferenças relevantes entre os tratamentos.

As combinações de *M. anisopliae* + *B. bassiana*, *M. anisopliae* + DsGV e *M. anisopliae* + *B. bassiana* + DsGV demonstraram potencial para o controle de lagartas de *D. saccharalis* por apresentar efeito aditivo entre os patógenos. A mistura de *B. bassiana* e DsGV não deve ser recomendada pois apresentou efeito antagônico. Estudos futuros avaliando a natureza da interação entre esses patógenos em diferentes condições ambientais são necessários para avaliar o potencial dessas combinações para o manejo de *D. saccharalis* em condições de campo.

Referências

- ACEVEDO, J.P.M.; SAMUES, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 187-192, 2007.
- ALATORRE-ROSAS, R.; KAYA, H. Interspecific Competition between Entomopathogenic Nematodes in the Genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an Insect Host in Sand. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 179-188, 1990.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole. 1986. 407 p.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.
- ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 172-180, 2004.
- AOKI, J. Mixed infection of the gypsy moth, *Lymantria dispar japonica* Motschulsky (Lepidoptera: Lymantriidae), in a larch forest by *Entomophthora aulicae* (Reich.) Sorok. and *Paecilomyces canadensis* (Vuill.) Brown et Smith. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo. v.9, p. 185-190, 1974.
- ARNE, C. N.; NORDIN, G. L. Enhancement of indices of viral infection by simultaneously administering *Helicoverpa zea* and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses to larval *Helicoverpa zea* (Boddie). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 66, p. 18-24. 1995.
- BAILEY, L. Susceptibility of the Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus, infested with *Acarapis woodi* (Rennie) to infection by airborne pathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 7, p. 141-143, 1965.
- _____. The Measurement and Interrelationships of Infections with *Nosema apis* and *Malpighamoeba mellificae* of honney-bee populations. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p.175-179, 1968.
- BAJAN, C.; KMITOWA, K. Successive infection. **Ekologia Polska**, Warszawa, v. 20, p. 433-440, 1972.
- BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the Entomogenous Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 255-234, 1990.

BAUER, L.S.; MILLER, D.L.; MADDOX, J.V.; MCMANUS, M.L. Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and Nuclear Polyhedrosis Virus Infecting the Gypsy Moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 147-153, 1998.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. **Principles of insect pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1998. 586 p.

CHANDLER, D.; HEALE, J.B.; GILLESPIE, A.T. Competitive interaction between strains of *Verticillium lecanii* on two insect hosts. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, p. 435-440, 1993.

COLLETT, D. **Modeling binary data**. New York: Chapman & Hall, 1991. 369 p.

COX, F.E.G. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, Cambridge, v. 122, p. S23-S38, 2001.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, Stanford. v. 23, p. 409-442, 1978.

FRANK, S.A. Models of parasite virulence. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 71, p. 37-78, 1996

FUXA, J.R. Interactions of the Microsporidium *Vairimorpha necatrix* with a Bacterium, Virus and Fungus in *Heliothis zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 33, p. 316-323, 1979.

GIANNOULIS, P.; BROOKS, C.L.; DUNPHY, G.B.; MANDATO, C.A.; NIVEN, D.F.; ZAKARIAN, R.J. Interaction of the bacteria *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) and *Bacillus subtilis* (Bacillaceae) with the hemocytes of larval *Malacosoma disstria* (Insecta: Lepidoptera: Lasiocampidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 94, p.20-30, 2007.

GOERTZ, D.; HOCH, G. Three microsporidian pathogens infectiong *Lymantria dispar* larvae do not differ in their success in horizontal transmission. **Journal Applied Entomology**, Berlin, v.133, p. 568-570, 2009.

GUZMÁN-FRANCO, A.W.; CLARK, S.J.; ALDERSON, P.G.; PELL, J.K. Competition and co-existence of *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*, two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 1312-1321, 2009

HACKETT, K.J.; BOORE, A.; DEMING, C.; BUCKLEY, E.; CAMP, M.; SHAPIRO, M. *Helicoverpa armigera* Granulovirus Interference with Progression of *H. zea* Nucleopolyhedrovirus Disease in *H. zea* Larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 75, p. 99-106, 2000.

HENSLEY, S. D., HAMMOND, A. H. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 61, p. 1742-1743, 1968.

HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Biology Letters**, London, v. 271, p. 104-106, 2004.

HUGHES, W.O.H.; PETERSEN, K.S.; UGELVIG, L.V.; PEDERSEN, D.; THOMSEN, L.; POULSEN, M.; BOOMSMA, J.J. Density-dependence and within-host competition in a semelparous parasite of leaf-cutting ants. **Evolutionary Biology**, New York, v. 4, p. 45-57, 2004.

HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G.; VEY, A. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defence response of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, p. 152-158, 1993.

HURPIN, B.; ROBERT, P. Experiments on Simultaneous Infections of the Common Cockchafer *Melolontha melolontha*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 11, p. 203-213, 1968.

HUXHAM, I.M.; LACKIE, A.M.; MCCORKINDALE, N.J. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on the cellular immunity in insects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 35, p. 97-105, 1989

INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; KAWCHUK, L.M.; GOETTEL, M.S. Influence of Oscillating Temperatures on the Competitive Infection and Colonization of the Migratory Grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flooviride*. **Biological Control**, Orlando, v. 14, p. 111-120, 1999.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; CHENG, K.J.; GOETTEL, M.S. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. **Biological Control**, Orlando, v. 8, p. 143-152, 1997.

ISHII, T.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; KUNIMI, Y. Growth characterizes and competitive abilities of a nucleopolyhedrovirus and an entomopoxvirus in larvae of the smaller tea tortrix *Adoxophyes bonnai* (Lepidoptera: Tortricidae). **Biological Control**, Orlando, v. 23, p. 96-105, 2002.

KOPPENHÖFER, A.M.; KAYA, H.K. Additive and Synergist Interaction between Entomopathogenic Nematodes and *Bacillus thuringiensis* for Scarab Grub Control. **Biological Control**, Orlando, v. 8, p. 131-137, 1997.

KOPPENHÖFER, A.M.; CHOO, H.Y.; KAYA, H.K.; LEE, D.W.; GELERNTER, W.D. Increased Field and Greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. **Biological Control**, Orlando, v. 14, p. 37-44, 1999.

KRAUSS, U.; HIDALGO, E.; ARROYO, C.; PIPER, S.R. Interaction Between the Entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the Mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 331-346, 2004.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F.; BERTIOLI, D.J. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains co-infecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 409-414. 2000

LECUONA, R.E.; ALVES, S.B. Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. and granulose virus on *Diatraea saccharalis* (F., 1794) at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**. Berlin, v. 105, p. 223-228. 1988.

LOWE, R.E.; PASCHKE, J.D. Simultaneous Infection with the Nucleopolyhedrosis and Granulosis Viruses of *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 86-92, 1968.

_____. Pathology of a double viral infection of *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 438-443, 1968.

MA, X.; LIU, X.; NING, X.; ZHANG, B.; HAN, F.; GUAN, X.; TAN, Y.; ZHANG, Q. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin CRY1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, p. 123-128, 2008.

MALAKAR, R.; ELKINTON, J.S.; HAJEK, A.E.; BURAND, J.P. Within-Host Interactions of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis Virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, p. 91-100, 1999.

MARANGA, R.O.; KAAYA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 159, p. 527-532, 2005.

MARZBAN, R.; HE, Q.; LIU, X.; ZHANG, Q. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 101, p. 71-76, 2009.

MAY, R.M.; NOWAK, M.A. Confection and the evolution of parasite virulence. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, London, v. B206, p. 209-215, 1995

MEAD, G. P.; RATCLIFFE, N. A.; RENWRANTZ, L. R. The separation of insect hemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 67, p. 167-177. 1986

NOWAK, M.A., MAY, R.M. Superinfection and the evolution of virulence. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, London, v. B255, p. 81-89, 1994.

PERLMAN, S.J.; JAENIKE, J. Competitive interactions and persistence of two nematode species that parasitize *Drosophila recens*. **Ecology Letters**, Oxford, v.4, p. 577-584, 2001.

PUZA, V.; MRÁČEK, Z. Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema kraussei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 102, p. 40-43, 2009.

RAO, C.U.M.; UMA DEVI, H.; KHAN, P.A.A. Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* (Hypocerales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, p. 221-232, 2006.

RAYMOND, B.; DAVIS, D.; BONSALL, M.B. Competition and reproduction in mixed infections of pathogenic and non-pathogenic *Bacillus* spp. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 151-155, 2007.

RAYMOND, B.; SAYYED, A.H.; WRIGHT, D.J. The compatibility of a nucleopolyhedrosis virus control with resistance management for *Bacillus thuringiensis*: Co-infection and cross-resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 93, p. 114-120, 2006.

RAYMOND, B.; LIJEK, R.S.; GRIFFITHS, R.I.; BONSALL, M.B. Ecological consequences of ingestion of *Bacillus cereus* on *Bacillus thuringiensis* infections and on the gut flora of a lepidopteran host. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, p. 103-111, 2008.

READ, A.F.; TAYLOR, L.H. The ecology of genetically diverse infections. **Science**. Washington, v. 292. p. 1099-1102. 2001

RITTER, K.S.; TANADA, Y. Interference between two nuclear polyhedrosis viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipunctata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomophaga**, Paris, v. 23, p. 349-359, 1978.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 127 p.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT® user guide**, version 9.1. Cary, 2003.

SHAPIRO-ILAN, D.; JACKSON, M.; REILLY, C.C.; HOTCHKISS, M.W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 119-126, 2004.

SOLTER, L.F.; SIEGEL, J.P.; PILARSKA, D.K.; HIGGS, M.C. The impact of mixed infection of three species of microsporidia isolated from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, p. 103-113, 2002.

SUTÁKOVÁ, G.; REHÁČEK, J. Mixed Infection of *Rickettsiella phytoseiuli* and *Coxiella burnetti* in *Dermacentor reticulatus* female ticks: electron microscope study. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 407-416, 1990.

TABASHNIK, B.E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3343-3346, 1992.

TANADA, Y.; HUKUHARA. A nonsynergistic strain of a Granulosis Virus of the armyworm *Pseudaleia unipuncta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 263-268, 1968.

THOMAS, M.B.; WATSON, E.L.; VALVERDE-GARCIA, P. Mixed infections and insect-pathogen interactions. **Ecology Letters**, Oxford, v. 6, p. 183-188, 2003.

TOUNOU, A.K.; KOOYMAN, C.; DOURO-KPINDOU, O.D.; POEHLING, H.M. Combined field efficacy of *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for the control of sahelian grasshoppers. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 53, p. 813-828, 2008.

TROUDEAU, D.; WASHBURN, J.; VOLKMAN, L.E. Central hole of haemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrosis pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, p. 996-1003, 2001.

WANG, C.S.; LI, Z.Z.; BUTT, T.M. Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of invertebrate Pathology**, San Diego, v. 80, p. 29-34, 2002.

WASHBURN, J.O.; HAAS-STAPLETOA, E.J.; TAN, F.F.; BECKAGE, N.E.; VOLKMAN, L.E. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, p. 179-190, 2000.

WHITLOCK, V.H. Simultaneous Treatments of *Heliothis armigera* with a Nuclear Polyhedrosis and a Granulosis Virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 29, p. 297-303, 1977.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 90, p. 139-150, 2005.

WYSOKI, M.; RACCAH, B. A Synergistic effect of two pathogenic bacteria from the enterobacteriaceae on the Gemetrid *Boarmia selenaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 35, p. 209-210, 1980.

3 SUSCETIBILIDADE DE DUAS POPULAÇÕES DE LABORATÓRIO DE *D. saccharalis* (Fabr.) AOS FUNGOS *M. anisopliae* (Metsch.) E *B. bassiana* (Bals.)

Resumo

A suscetibilidade de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis*, oriundas de duas populações de laboratório, foi determinada para os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Em experimento realizado em 2008, a mortalidade de lagartas oriundas de Piracicaba inoculadas com 5×10^8 conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi de $72 \pm 3,7\%$ e $72 \pm 7,3\%$, respectivamente. Em 2009, foi observado um decréscimo na mortalidade dessa população com relação ao bioensaio anterior, com mortalidades de $25 \pm 4,3\%$ na inoculação de *M. anisopliae* e $44 \pm 4\%$ para *B. bassiana*, enquanto a mortalidade de lagartas provenientes de Araras foi de $78 \pm 4,7\%$ e $78 \pm 5,8\%$ para *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Dessa forma foi realizado um terceiro bioensaio em que lagartas das duas populações e da progênie (F1) dos cruzamentos diretos entre elas, criadas nas mesmas condições bióticas e abióticas, foram comparadas quanto à suscetibilidade aos dois fungos entomopatogênicos. Não foram observadas diferenças significativas de suscetibilidade entre as populações e os cruzamentos, descartando a hipótese de que a diminuição na mortalidade na população de Piracicaba estivesse relacionada a fatores genéticos. As diferenças observadas devem estar provavelmente relacionadas às variações no sistema de criação, em componentes nutricionais e antimicrobianos da dieta.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis*; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Suscetibilidade diferencial; Populações de laboratório, Antimicrobianos

SUSCEPTIBILITY OF TWO LABORATORY POPULATIONS OF *D. saccharalis* (Fabr.) TO THE FUNGI *M. anisopliae* (Metsch.) and *B. bassiana* (Bals.)

Abstract

The susceptibility of caterpillars from the third instar of *Diatraea saccharalis*, deriving from two distinct laboratory populations was determined for the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. In an experiment carried out on 2008, mortality of caterpillars originally from Piracicaba inoculated with 5×10^8 conidia of *M. anisopliae* and *B. bassiana* was $72 \pm 3.7\%$ and $72 \pm 7.3\%$, respectively. In 2009, it was observed a lower mortality of this population in relation to the previous bioassay, with mortality of $25 \pm 4.3\%$ with the inoculation of *M. anisopliae* and $44 \pm 4\%$ with *B. bassiana*, while the mortality for caterpillars originally from Araras was $78 \pm 4.7\%$ and $78 \pm 5.8\%$ for *M. anisopliae* and *B. bassiana*. Therefore, a third bioassay was performed in which caterpillars from both populations, as well as caterpillars deriving from direct breeding of the two populations (F1), were reared in the same biotic and abiotic conditions and compared as for susceptibility to the two entomopathogenic fungi. It was not observed statistical differences in the susceptibility among the different populations

and the crossings, rejecting the hypothesis that the reduction in the mortalities of the population from Piracicaba was related to genetic factors. The differences observed are most likely to be related to variations in the rearing system, in nutritional and antimicrobial components of the diet.

Keywords: *Diatraea saccharalis*; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Differential susceptibility; Laboratory populations; Antimicrobial

3.1 Introdução

Os principais fatores envolvidos no início e progressão das doenças infecciosas em insetos são a virulência das populações de patógenos, eficiência da taxa de transmissão e a suscetibilidade da população do hospedeiro ao patógeno. Todos esses fatores são influenciados pelas condições bióticas e abióticas do ambiente. Dentre as características da população do hospedeiro que afetam significativamente a dinâmica da infecção destacam-se a suscetibilidade, densidade populacional, comportamento e a associação com populações de outras espécies (WATANABE, 1987).

A diferença de suscetibilidade de populações de uma espécie de inseto a um mesmo entomopatógeno é um aspecto importante para o controle biológico de pragas, mas é relativamente reduzido o número de estudos conduzidos nesta área. Ossowski (1960) observou que um vírus da poliedrose nuclear foi mais virulento para uma população de *Kotochalia junodi* (Heylaerts; 1890) (Lep: Psychidae) de uma localidade distante do local onde o vírus foi isolado quando comparado a uma população da mesma origem do isolado viral. Variações consideráveis de suscetibilidade de populações de campo de *Phthorimaea operculella* (Zeller; 1873) (Lep.: Gelechiidae) foram observadas na resposta a aplicação de um GV (BRIESE, 1981). Hunter e Hoffmann (1973) observaram uma diferença de sete vezes na CL₅₀ entre duas populações de *Plodia interpunctella* (Hubner; 1813) (Lep.: Pyralidae) a um GV. Papierok e Winding (1979) reportaram diferenças entre dois clones do afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Harris; 1776) (Hemiptera: Aphididae) quanto à suscetibilidade a *Conidiobolus obscurus* (Hall & Dunn) Remaudiere & Keller. Milner (1982) estudando a mesma espécie de afídeo evidenciou diferenças de suscetibilidade entre dois biótipos de uma população de campo quanto à suscetibilidade para *Erynia neoaphidis* (Remaudière; Hennebert; 1980) (Zygomycetes: Entomophthorales).

Keller et al. (1999) observaram diferenças significativas na virulência de 8 isolados de *B. brongniartii* (Sacc.) Petch para duas populações de *Melolontha melolontha* (Linnaeus; 1758) (Coleoptera: Scarabaeidae), uma originária da Itália e outra da Suíça. Os autores discutiram que a diferença de suscetibilidade pode estar relacionada com o histórico das populações e com a coexistência dessas com *B. brongniartii*.

Uma Devi et al. (2008) evidenciaram diferenças na virulência de cinco isolados de *B. bassiana* para diferentes populações de *Spodoptera litura* (Fabricius; 1775) (Lep: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* (Hübner; 1805) (Lep: Noctuidae). Cada espécie de inseto apresentou uma população mais suscetível, sendo a mesma para todos os isolados de *B. bassiana*. Abelhas de colônias distintas tiveram mortalidades significativamente diferentes quando expostas a *Bacillus larvae* (ROTHENBUHLER; THOMPSON, 1956).

Uma população de laboratório de *Conoderus falli* (Lane) (Coleoptera: Elateridae) tratada com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae) apresentou um TL₅₀ significativamente maior do que uma população originária do campo (BELL; HAMALLE, 1971). As diferenças de suscetibilidade de colônias, populações, raças ou strains de uma espécie de inseto a um patógeno exemplificadas acima, podem estar relacionadas ao grau de exposição ao patógeno durante muitas gerações (WATANABE, 1987).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra as doenças são a defesa cuticular contra a penetração, propriedades da hemolinfa contra o crescimento fúngico e resistência aos metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos (WATANABE, 1987). Estes mecanismos são regulados pela resistência genética do hospedeiro. Ignoffo et al. (1982) e Aratake (1961) demonstraram que a suscetibilidade diferencial de populações de insetos a fungos entomopatogênicos estava relacionada essencialmente a propriedades da hemolinfa.

Existem evidências de que a qualidade do alimento disponibilizado ao inseto pode influenciar a dinâmica da doença causada por vírus (SHVETSOVA, 1950; PIMENTEL; SHAPIRO, 1962; EBIHARA, 1966; MATSUBARA; HAYASHIYA, 1969; DAVID; ELLABY; TAYLOR, 1972; WATANABE; IMANISHI, 1980), bactérias (ROSE;

BRIGGS, 1969; RINDERER; ROTHENBUHLER, 1969; RINDERER; ROTHENBUHLER; GOCHNAUER, 1974) e fungos (PRISTAVKO; DOVZHENOK, 1974; RAMOSKA; TODD, 1985, RAGHAVIAH; JAYARAMAIAH, 1987; COSTA; GAUGLER, 1989a 1989b; GALLARDO et al, 1990; FARGUES; MANIANIA, 1992; GOETTEL et al, 1993).

A broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*, vem sendo criado em larga escala no Brasil, por diversos laboratórios para produção do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cameron; 1891) (Hymenoptera: Braconidae) utilizado em 1.700.000 hectares de cana anualmente (PARRA, 2002). Pela facilidade de obtenção, *D. saccharalis*, vem sendo bastante utilizado em experimentos em diversas áreas do conhecimento. Na área de patologia e controle microbiano, *D. saccharalis* tem sido utilizado para caracterização de isolados de entomopatógenos quanto à virulência, especificidade e revigoramento da virulência de isolados produzidos massalmente para fins comerciais. Entretanto, em alguns estudos por problemas nas criações dos insetos, são utilizadas populações diferentes e os resultados não são reproduzidos. Isto levanta o questionamento de que possa ser devido a uma suscetibilidade diferencial das populações de insetos usadas.

Nesse contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a suscetibilidade de duas populações de laboratório de *Diatraea saccharalis* para os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

3.2 Materiais e Métodos.

3.2.1 Insetos

As populações de insetos usadas foram criadas seguindo metodologia modificada de King e Hartley (1985), sobre dieta artificial modificada de Hensley e Hammond (1968) (Tabela 1). Os lepidópteros foram mantidos durante a fase imatura (5 lagartas por tubo) em tubos de vidro contendo aproximadamente 10mL de dieta artificial e acomodados em sala climatizada com temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase. As pupas e os adultos foram transferidos para gaiolas mantidas em sala de criação, sendo que para os adultos ofereceu-se apenas água. As condições da sala de criação apesar de monitoradas, não foram controladas, permanecendo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase. As lagartas destinadas aos bioensaios foram provenientes da

segunda postura de cada fêmea, sendo colocadas 15 lagartas em cada tubo de dieta até atingirem o terceiro ínstar quando foram utilizadas nos bioensaios.

Os ensaios com a população de Piracicaba foram realizados com insetos provenientes da criação do laboratório de Biologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo em Piracicaba- SP. A população de *D. saccharalis* mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP, Piracicaba-SP desde janeiro de 2009 foi obtida junto a Universidade federal de São Carlos, Araras-SP e constituiu a fonte de insetos para os ensaios com a população de Araras.

Para a realização do bioensaio que objetivou determinar a suscetibilidade das duas populações de insetos bem como do cruzamento direto entre elas, foram obtidas pupas da população de Piracicaba e de Araras. No laboratório de Patologia e Controle Microbiano as pupas foram sexadas e casais formados com ♂ e ♀ de Piracicaba, ♂ e ♀ de Araras, ♂ Piracicaba e ♀ Araras e ♂ Araras e ♀ Piracicaba. As lagartas provenientes destes acasalamentos foram transferidas para tubos contendo dieta. Desde a emergência dos adultos até a utilização das lagartas de cada uma das combinações no bioensaio os indivíduos foram submetidos às mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade, bem como foram alimentados com o mesmo lote de dieta artificial. Esse procedimento foi seguido para evitar a influência de fatores externos no desenvolvimento dos insetos que poderiam afetar os resultados.

3.2.2 Fungos

Os fungos *B. bassiana* (ESALQ-PL63), isolado de *Atta* sp. (Hymenoptera: Formicidae) procedente de Piracicaba-SP e *M. anisopliae* (ESALQ-1037) inicialmente obtido de *Solenopsis* sp. (Hymenoptera: Formicidae) procedente de Porto Alegre-RS, encontram-se armazenados no banco de entomopatógenos do laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ-USP, na forma de conídios puros em freezer (- 4°C) e em meio de cultura sob óleo mineral.

Os conídios de cada um dos fungos utilizados nos bioensaios foram produzidos em placas de Petri contendo meio B.D.A. (Difco®). As placas foram incubadas em

câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase), durante 10 dias, até que ocorresse a conidiogênese. Após o período de incubação os conídios foram raspados das placas e transferidos para 10mL de água estéril contendo espalhante adesivo (0,01% de Tween[®] 80), as suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer e em seguida calibradas, resultando nas concentrações $2,5 \times 10^8$ e 5×10^8 conídios.mL⁻¹. A viabilidade dos conídios foi checada, inoculando-se 0,1mL das duas suspensões iniciais em placas de Petri contendo meio B.D.A., essas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase) durante 24 horas e a proporção de conídios viáveis foi verificada ao microscópio de luz. Os fungos apresentaram viabilidade superior a 95%.

Tabela 1 - Composição da dieta artificial modificada de Hensley, Hammond (1968)

Componentes	Quantidade
Germe de trigo	15,00g
Farelo de soja	54,00g
Açúcar	52,50g
Sais de Wesson	7,50g
Ácido ascórbico	1,90g
Cloreto de colina	0,40g
Vita Gold®	0,40mL
Solução vitamínica*	11,30mL
Metil parahidroxibenzoato (Nipagin)	3,00g
Formaldeído (37,2%)	0,75mL
Antibiótico	0,13g
Agar	11,30g
Água destilada	900mL
Solução vitamínica*	
Niaciamida	1,00g
Pantotenato de cálcio	1,00g
Riboflavina	0,50g
Tiamina	0,25g
Piridoxina	0,25g
Ácido fólico	0,10g
Biotina	0,02mg
Vitamina B12 (1000mg/mL)	2,00mL

* Em 1000 mL de água destilada

3.2.3 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP. Em todos os experimentos foram utilizadas lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis*, que foram lavadas em água destilada para a retirada do excesso de dieta artificial. Em placas de Petri (1,5 cm de altura e 15 cm de diâmetro) foram colocadas 50 lagartas e pulverizadas em torre de Potter (15 lb/pol²) com 2,5 mL de água destilada estéril + espalhante adesivo (0,01% de Tween[®] 80) nas testemunhas ou com o mesmo volume de suspensões fúngicas. As lagartas foram mantidas nas placas por 1 minuto e então foram transferidas, em grupos de 10, para placas de bioensaio (1,5 cm de altura e 6 cm de diâmetro) contendo porções de dieta modificada de Hensley e Hammond (1968) isenta de formaldeído e metil-parahidroxibenzoato (Nipagin). Todos os tratamentos foram divididos em 5 repetições de 10 insetos e mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase). As avaliações foram realizadas diariamente, durante 14 dias sendo o alimento trocado diariamente.

3.2.3.1 População de Piracicaba 2008

O primeiro bioensaio foi realizado em junho de 2008, utilizando apenas insetos provenientes de Piracicaba. As suspensões de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram pulverizadas na concentração de 5×10^8 conídios.mL⁻¹, e o controle somente foi pulverizado com água + 0,01% de Tween[®] 80.

3.2.3.2 Piracicaba e Araras 2009

O segundo experimento foi realizado em janeiro de 2009, comparando as duas populações de insetos. Lagartas de primeiro ínstar e a dieta artificial foram obtidas junto ao Laboratório de Biologia de Insetos (População de Piracicaba) e mantidas nas mesmas condições dos insetos criados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (População de Araras) até atingirem o terceiro ínstar.

Posteriormente foram pulverizadas com suspensões de *M. anisopliae* nas concentrações $2,5 \times 10^8$ e 5×10^8 conídios.mL⁻¹ e *B. bassiana* apenas na maior concentração, além de um controle para cada população de insetos pulverizados com água + 0,01% de Tween[®] 80. O ensaio foi repetido uma vez.

3.2.3.3 Piracicaba, Araras e cruzamentos 2009

No terceiro bioensaio comparou-se as duas populações bem como os cruzamentos diretos entre elas (F1), sendo que o desenvolvimento dos insetos ocorreu nas mesmas condições. Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram utilizados na concentração de 5×10^8 conídios.mL⁻¹, além de quatro testemunhas correspondendo a cada uma das populações e cruzamentos sem aplicação de fungos.

3.2.4 Análises estatísticas

A relação entre mortalidade e tempo de exposição aos patógenos, foi descrita pelo modelo Probit de distribuição binomial. Este modelo pode ser descrito pela equação: $\pi = \Phi(\alpha + \beta x_i)$. A seleção deste modelo baseou-se no valor de *deviance* (razão de χ^2 Pearson pelo grau de liberdade do experimento) e no teste da “razão do log-verossimilhança”, comparados com outros modelos, tais como complemento log-log e logístico. Quando necessário, considerou-se o fator de heterogeneidade no cálculo das concentrações letais e seus respectivos intervalos de confiança para conjuntos de dados com valor de χ^2 Pearson significativo, que indica superdispersão dos dados (*deviance* > 1) (COLLETT, 1991). Dessa forma, os tempos letais (TL₅₀) com seus respectivos intervalos de confiança foram estimados usando o procedimento PROBIT do programa SAS 9.1.3, e comparados entre si pelo método da sobreposição de intervalos de confiança (os valores de TL₅₀ não são significativamente diferentes entre si quando seus respectivos IC95% se sobrepõem).

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variâncias e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados foram transformados para

atender as exigências de homocedasticidade, dessa forma os dados de mortalidade foram transformados em $\log(x+1)$ nos dois primeiros bioensaios e $\sqrt{x+0,5}$ no terceiro.

3.3 Resultados

3.3.1 População de Piracicaba 2008

A mortalidade causada pelos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, no ensaio realizado em junho de 2008, foi alta demonstrando a suscetibilidade da população de Piracicaba (Tabela 2). Não se observou diferenças nas mortalidades causadas por *M. anisopliae* e *B. bassiana* que foram superiores a mortalidade no controle ($F_{2, 14} = 1480$; $p < 0,0001$). Da mesma forma, não se observou diferença na virulência dos fungos demonstrada pelos intervalos de confiança do tempo letal mediano de 3,4 - 4,9 dias e 4,4 - 6,1 dias para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente

Tabela 2 - Tempos letais medianos (TL₅₀) estimados pelo modelo Probit e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) para a relação entre tempo de exposição aos patógenos e mortalidade. Porcentagem média de mortalidade ($\pm$ EPM) de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea sachharalis*

População	Tratamento	%Mortalidade ($\pm$ EPM)	^A TL ₅₀ (dias)	^B IC95% (dias)	^C Slope ($\pm$ EP)	^D χ^2 (p)
Piracicaba	<i>M. anisopliae</i> 5 $\times$ 10 ⁸	72 $\pm$ 3,7 A	4,1	(3,4; 4,9)	2,56 $\pm$ 0,27	111,46 (p = 0,0001)
	<i>B. bassiana</i> 5 $\times$ 10 ⁸	72 $\pm$ 7,3 A	5,2	(4,4; 6,1)	2,92 $\pm$ 0,30	103,90 (p = 0,0007)
	Testemunha	0 $\pm$ 0 B	^E —	—	—	—

Médias ($\pm$ EPM) seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente (Tukey, $p > 0,05$). ^A Tempo letal para matar 50% dos indivíduos. ^B IC = intervalo de confiança. ^C Coeficiente angular. ^D Valores de χ^2 de Pearson para o teste do modelo. ^E Não atingiu 50% de mortalidade.

3.3.2 Piracicaba e Araras 2009

No segundo bioensaio realizado em janeiro de 2009 ficou evidente a menor suscetibilidade dos insetos da população de Piracicaba aos patógenos quando comparada à população de Araras (Tabela 3). A mortalidade dos insetos de Piracicaba foi de somente 25 $\pm$ 4,3% e 44 $\pm$ 4% quando foi aplicado 5 $\times$ 10⁸ conídios.mL⁻¹ de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Os mesmos fungos nesta concentração mataram em média

78% dos insetos oriundos de Araras. Todas as comparações dos tratamentos entre as duas populações foram significativamente diferentes ($F_{7, 79} = 206,84$; $p < 0,0001$). Diferenças na porcentagem de mortalidade entre as duas populações variaram entre 53 e 30% na maior e menor concentração de *M. anisopliae*, respectivamente. Não houve diferença entre os tratamentos com insetos de Araras com relação, tanto a mortalidade total ($F_{7, 79} = 206,84$; $p > 0,05$) quanto os tempos letais medianos (TL₅₀) da população de Araras foram semelhantes para os tratamentos com os dois fungos. Os insetos da população de Piracicaba apresentaram sinais (pontos) de penetração pelos patógenos, entretanto esses indivíduos continuaram vivos (Figura 1A). Alguns insetos dessa população morreram infectados, mas após um período extremamente longo (pupa e adulto recém-emergido) (Figuras 1C e 1D) o que não foi observado na população de Araras.

Tabela 3 - Porcentagem média de mortalidade ($\pm$ EPM) de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis*. Tempos letais (TL₅₀) estimados pelo modelo Probit e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) para a relação entre tempo de exposição aos patógenos e mortalidade

População	Tratamento	%Mortalidade ($\pm$ EPM)	^A TL ₅₀ (dias)	^B IC95% (dias)	^C Slope ($\pm$ EP)	^D χ^2 (p)
Piracicaba	<i>M. anisopliae</i> 2,5 $\times$ 10 ⁸	31 $\pm$ 3,8 CD	^E —	—	—	—
	<i>M. anisopliae</i> 5 $\times$ 10 ⁸	25 $\pm$ 4,3 D	—	—	—	—
	<i>B. bassiana</i> 5 $\times$ 10 ⁸	44 $\pm$ 4 BC	—	—	—	—
	Testemunha	0 $\pm$ 0 E	—	—	—	—
Araras	<i>M. anisopliae</i> 2,5 $\times$ 10 ⁸	61 $\pm$ 7,8 AB	6,6	(5,7; 7,5)	2,72 $\pm$ 0,26	364,6 ($p < 0,0001$)
	<i>M. anisopliae</i> 5 $\times$ 10 ⁸	78 $\pm$ 4,7 A	5,2	(4,6; 5,8)	3,31 $\pm$ 0,26	345,8 ($p < 0,0001$)
	<i>B. bassiana</i> 5 $\times$ 10 ⁸	78 $\pm$ 5,8 A	5,5	(4,7; 6,2)	3,62 $\pm$ 0,34	124,4 ($p < 0,0001$)
	Testemunha	1 $\pm$ 1 E	—	—	—	—

Médias ($\pm$ EPM) seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente (Tukey, $p > 0,05$). ^A Tempo letal para matar 50% dos indivíduos. ^B IC = intervalo de confiança. ^C Coeficiente angular. ^D Valores de χ^2 de Pearson para o teste do modelo. ^E Não atingiu 50% de mortalidade.

Figura 1 - Insetos provenientes da população de Piracicaba com manifestação tardia dos sintomas de infecção por *Metarhizium anisopliae*. Lagarta de 5º ínstar (A); Retenção dos caracteres larvais (B); Pupa (C); Adulto recém-emergido (D)

3.3.3 Piracicaba, Araras e cruzamentos 2009

As mortalidades causadas pela aplicação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* nas populações originais de Piracicaba e de Araras não diferiram significativamente e foram semelhantes as mortalidades em todos os cruzamentos destas duas populações (Tabela 4). Os insetos que não receberam aplicações dos fungos tiveram uma baixa mortalidade em relação aos tratamentos ($F_{11, 59} = 112,55$, $p < 0,0001$). A mortalidade de lagartas variou de $92 \pm 3,7\%$ no tratamento com a aplicação de *M. anisopliae* na população de Piracicaba a $64 \pm 4\%$ no tratamento com o mesmo patógeno em lagartas provenientes do cruzamento de machos de Araras e fêmeas de Piracicaba. O TL_{50} não diferiu entre os tratamentos, exceto pelo tratamento em que foi inoculado *M. anisopliae*

em insetos da população de Piracicaba que apresentou TL_{50} (3,1 dias, 2,4 - 3,7) menor do que a população resultante do cruzamento de machos de Araras com fêmeas de Piracicaba (5,3 dias, 4,4 - 6,2) e entre machos de Piracicaba e fêmeas de Araras (4,7 dias, 3,7 - 5,7).

Tabela 4 - Porcentagem média de mortalidade ($\pm$ EPM) de lagartas de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis*. Tempos letais (TL_{50}) estimados pelo modelo Probit e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) para a relação entre tempo de exposição aos patógenos e mortalidade

População	Tratamento	%Mortalidade ($\pm$ EPM)	^A TL_{50} (dias)	^B IC95% (dias)	^C Slope ($\pm$ EP)	^D χ^2 (p)
♂Araras	<i>M. anisopliae</i> 5×10^8	74 $\pm$ 5,9 A	3,5	(2,5; 4,5)	1,71 $\pm$ 0,19	85,70 (p = 0,0615)
	<i>B. bassiana</i> 5×10^8	84 $\pm$ 4 A	3,8	(3,1; 4,5)	3,11 $\pm$ 0,31	135,61 (p < 0,0001)
	Testemunha	2 $\pm$ 2 B	^E —	—	—	—
♂Piracicaba	<i>M. anisopliae</i> 5×10^8	92 $\pm$ 3,7 A	3,1	(2,4; 3,7)	3,15 $\pm$ 0,29	119,04 (p < 0,0001)
	<i>B. bassiana</i> 5×10^8	82 $\pm$ 2 A	4,0	(3,3; 4,6)	2,68 $\pm$ 0,24	100,17 (p = 0,0054)
	Testemunha	2 $\pm$ 2 B	—	—	—	—
♀Araras	<i>M. anisopliae</i> 5×10^8	64 $\pm$ 4 A	5,3	(4,4; 6,2)	2,01 $\pm$ 0,18	61,56 (p = 0,664)
	<i>B. bassiana</i> 5×10^8	78 $\pm$ 4,9 A	4,3	(3,6; 5,0)	2,71 $\pm$ 0,24	94,46 (p = 0,0128)
	Testemunha	2 $\pm$ 2 B	—	—	—	—
♀Piracicaba	<i>M. anisopliae</i> 5×10^8	68 $\pm$ 4,9 A	4,7	(3,7; 5,7)	2,16 $\pm$ 0,22	96,26 (p = 0,0111)
	<i>B. bassiana</i> 5×10^8	84 $\pm$ 5,1 A	3,9	(3,2; 4,7)	2,58 $\pm$ 0,26	122,67 (p < 0,0001)
	Testemunha	2 $\pm$ 2 B	—	—	—	—

Médias ($\pm$ EPM) seguidas pelas mesmas letras não diferiram significativamente (Tukey, $p > 0,05$). ^A Tempo letal para matar 50% dos indivíduos. ^B IC = intervalo de confiança. ^C Coeficiente angular. ^D Valores de χ^2 de Pearson para o teste do modelo. ^E Não atingiu 50% de mortalidade.

3.4 Discussão

No experimento realizado em 2009, a suscetibilidade da população de Piracicaba aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi muito inferior ao observado no experimento realizado em 2008, o que levou a execução de novos ensaios comparando a população de Piracicaba com a população de Araras. Nesses ensaios ficou comprovada uma menor suscetibilidade dos insetos oriundos de Piracicaba em relação aos valores de mortalidade obtidos no bioensaio anterior (2008) e em relação a população de Araras. Quando estas populações foram avaliadas novamente, em conjunto com as populações resultantes dos cruzamentos diretos entre elas (F1), não foram observadas diferenças estatísticas nas mortalidades causadas pelos dois fungos entre nenhuma das populações. Este resultado refuta a hipótese de que a suscetibilidade diferencial fosse devido às populações dos insetos, que poderiam estar associados a fatores genéticos de resistência aos patógenos na população de Piracicaba.

Embora alguns estudos revelarem a suscetibilidade diferencial de populações do mesmo inseto a uma espécie de fungo (PAPIEROK; WINDING 1979; MILNER, 1982; KELLER; SCHWEIZER; SHAH, 1999; UMA DEVI et al., 2008), não existem estudos que comprovam o desenvolvimento de resistência em insetos de laboratório contra a infecção por fungos entomopatogênicos.

Mudanças na suscetibilidade podem ocorrer durante o ciclo de vida e são temporárias afetando somente o indivíduo, sendo que sua progênie não será necessariamente afetada. Outro tipo de variação na suscetibilidade é herdada pela progênie do indivíduo afetado (variação genética) e essas mudanças são acumuladas no decorrer das gerações (SINGH; MOORE, 1985). A diferença marcante de suscetibilidade entre as populações obtidas no segundo experimento pode ter ocorrido por influência dos fatores externos (abióticos) e de variações no alimento disponibilizado aos insetos. No último ensaio, quando não se detectou diferença de suscetibilidade entre as populações, os insetos foram mantidos nas mesmas condições, bem como foram alimentados com um único lote da dieta artificial desde a emergência dos adultos até o final do experimento. Embora os dois laboratórios (Araras e Piracicaba) utilizem a mesma metodologia de criação do inseto e dieta artificial com a mesma composição, é comum encontrar adaptações e diferenças nos ingredientes da

dieta. Por exemplo, diferentes marcas dos anti-contaminantes utilizados na dieta artificial ou até mesmo o aumento ou diminuição da concentração de algum desses compostos. Pristavko e Dovzhenok (1974) observaram que larvas de *Cydia pomonella* (L.) (Lep: Tortricidae) alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações de ácido ascórbico apresentaram variação de suscetibilidade para *B. bassiana*, sendo a contagem total de hemócitos bastante afetada. Alves et al. (1990) observaram que lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta de milho, apresentaram menor suscetibilidade aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em comparação com lagartas criadas em outros tipos de dieta.

Adultos de *Blissus leucopterus leucopterus* (Hemiptera: Lygaeidae) inoculados com *B. bassiana* e alimentados com trigo, cevada ou dieta artificial apresentaram mortalidade significativamente maior que insetos alimentados com milho ou sorgo (RAMOSKA; TODD, 1985). Poucos cadáveres apresentaram esporulação pelo patógenos quando os insetos foram alimentados com milho e sorgo, demonstrando um efeito inibitório adicional desses alimentos, provavelmente resultante do efeito de substâncias químicas secundárias, com efeito fungistático produzidas pelas plantas. O desenvolvimento de *Nomuraea rileyi* em *Helicoverpa zea* foi prejudicado, quando o inseto foi alimentado em dieta artificial com adição do glicoalcalóide tomatina (GALLARDO et al., 1990; HAJEK; LEGER, 1994).

Uma hipótese para explicar a diferença de suscetibilidade entre as populações no segundo bioensaio é a variação de algum componente da dieta (mudança de marca ou concentração), provavelmente dos antimicrobianos (metil-parahidroxibenzoato ou formaldeído) que pode ter resultado em um maior acúmulo desses componentes na hemolinfa dos insetos de Piracicaba, dessa forma prejudicando o desenvolvimento da infecção fúngica. Essa hipótese é fortalecida pelo fato dos insetos da população de Piracicaba terem apresentado pontos de penetração pelos patógenos e continuarem vivos e pela morte desses indivíduos nas fases finais do ciclo de desenvolvimento dos insetos.

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram a necessidade padronização de ensaios de virulência e testes de toxicidade com populações de insetos de laboratório. Quando possível é importante avaliar a virulência de patógenos

a diferentes populações do inseto hospedeiro, ou seja, insetos de diferentes criações ou localidades no caso de insetos coletados no campo, pois a população testada pode ter sido influenciada por fatores bióticos ou abióticos específicos que podem interferir no resultado do bioensaio. Isolados bastante virulentos podem ter seu potencial subestimado se avaliados sobre insetos com aumento da tolerância fisiológica ao ataque fúngico devido fatores bióticos, como por exemplo, excesso de anticontaminantes na dieta.

Referências

ALVES, S.B., BOTELHO, P.S.M., SALOMÃO, R., STIMAC, J.L. Influência de diferentes tipos de alimentos na suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabri, 1794) aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 19, p. 383-391, 1990.

ARATAKE, Y. Genetical analyses of the infection with muscardines of *Bombix mori* L. I. Infection with the white muscardine. **Bulletin of the Sericultural Experiment Station**, Suginami-machi, v. 17, p. 155-165, 1961-

BELL, J.V.; HAMALLE, R.J. Comparative mortalities between field-collected and laboratory-reared wireworm larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 18, p. 150-151, 1971.

BRIESE, D.T. The incidence of parasitism and disease in field populations of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) in Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, Brisbane, v. 20, p. 319-326, 1981.

COLLETT, D. **Modeling binary data**. New York: Chapman & Hall, 1991. 369 p

COSTA, S.D.; GAUGLER, R. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to solanine and tomatine: plant defensive chemicals inhibit an insect pathogen. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, p. 697-706, 1989a.

_____. Influence of *Solanum* host plants on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, p. 531-536, 1989b.

DAVID, W.; ELLABY, S.; TAYLOR, G. Rearing *Spodoptera exempta* on semi-synthetic diets and on growing maize. **Entomologia experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 19, p. 226-236, 1975

EBIHARA, T. Effect of Mulberry leaf quality on the resistance of silkworm to a cytoplasmic-polyhedrosis virus. **Sericultural Experimental Station**, Ibaraki, v. 1, p. 61-67, 1996.

FARGUES, J.; MANIANIA, N.K. Variabilite de la sensibilit de *Spodoptera littoralis* [Lep.: Noctuidae] a l'Hyphomycete entomopathogene *Nomuraea rileyi*. **Entomophaga**, Paris, v. 37, p. 545-549, 1992

GALLARDO, F.; BOETHEL, O.J.; FUXA, J.R.; RICHTER, A. Susceptibility of *Heliothis zea* (Boddie) larvae to *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson: effects of a-tomatine at the third trophic level. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 1751-1759, 1990.

GOETTEL, M.S.; VANDENBERG, J.D.; DUKE, G.M.; SCHAALJE, G.B. Susceptibility to chalkbrood of alfalfa leafcutter bees, *Megachile rotundata* reared on natural and artificial provisions. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 61, p. 58-61, 1993

HAJEK, A.E.; St. LEGER, R.S. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 293-322, 1994.

HENSLEY, S. D., HAMMOND, A. H. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 61, p. 1742-1743, 1968.

HUNTER, D.K.; HOFFMANN, D.F. Susceptibility of two strains of Indian meal moth to a granulosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 21, p. 114-115, 1973

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; KROHA, M.J. Susceptibility of larvae of *Trichoplusia ni* and *Anticarsia gemmatilis* to intrahemocelic injections of conidia and blastospores of *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 39, p. 198-202, 1982

KELLER, S.; SCHWEIZER, C.; SHAH, P. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 9, p. 441-446, 1999.

KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. v. 2, p. 265-270.

MATSUBARA, F.; HAYASHIYA, K. The susceptibility to the infection with nuclear polyhedrosis virus in the silkworm reared on artificial diet. **Journal of Sericultural Science of Japan**, Tokyo, v. 38, p. 43-48, 1969.

MILNER, R.I. On the occurrence of pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. resistant to isolates of the fungal pathogen *Erynia neoaphidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 32, p. 23-27, 1982.

OSSOWSKI, L.L.J. Variation in virulence of a wattle bagworm virus. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v.2, p. 35-43, 1960.

PAPIEROK, B.; WILDING, N. Mise en evidence d'une difference de sensibilité entre 2 clones du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* Harr. (Homopteres: Aphididae), expose à 2 souches du champignon Phycomycete *Entomophthora obscura* Hall & Dunn.

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Ser. D., Paris, v. 288, p. 93-95, 1979.

PARRA, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais. In; PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores.** São Paulo: Manole, 2002. cap. 9, p. 143-161.

PIMENTEL, D.; SHAPIRO, M. The influence of environmental on a virus-host relationship. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 4, p. 77-80, 1962.

PRISTAVKO, V.P.; DOVZHENOK, N.V. Ascorbic acid influence on larval blood cell number and susceptibility to bacterial and fungal infection in the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 24, p.165-168, 1974.

RAGHAVIAH, G.; JAYARAMAIAH, M. Antifungal activity of selected plant extracts against the white muscardine fungus. **Current Research**, Boston, v. 17, p. 62-64, 1987

RAMOSKA, W.A.; TODD, T.; Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, p. 146-148, 1985

RINDERER, T.E.; ROTHENBUHLER, W.C. Resistance to a american foulbrood in honey bees. IX. Comparative mortality of queen, worker and drone larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 13, p. 81-86, 1969.

RINDERER, T.E.; ROTHENBUHLER, W.C.; GOCHNAVER, T.A. The influence of pollen on the susceptibility of honey bee larvae to *Bacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v, 23, p. 347-350, 1974.

ROSE, R.; BRIGGS, J.D. Resistance to a American foulbrood in honey bees. IX. Effects of honey bees larval food on the growth and viability of *Bacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 13, p. 74-80, 1969.

ROTHENBUHLER, W.C.; THOMPSON, V.C. Resistance to American foulbrood in honeybees. I. Differential survival of larvae of different genetic lines. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.49, p.470-475, 1956

SHVETSOVA, O.I. The polyhedrovirus disease of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) and the role of the nutritional factor in virus diseases. **Mikrobiologiya**, Moskva, v. 19, p. 532-542, 1950

UMA DEVI, K.; PADMAVATHI, J.; RAO, C.V.M.; KHUAN, A.A.P.; MURALI, C. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, p. 975-989, 2008.

WATANABE, H. The host population. In: FUXA, J. R.; TANADA, Y. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. San Diego: Wiley-Interscience. 1987. chap. 4, p. 71-112.

WATANABE, H.; IMANISHI, S. The effect of the content of certain ingredients in an artificial diet on the susceptibility to virus infection in the silkworm, *Bombix mori*. **Journal of Sericultural Science of Japan**, Tokyo, v. 49, p. 404-409, 1980.