Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável

Daian Guilherme Pinto de Oliveira

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

Piracicaba
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Daian Guilherme Pinto de Oliveira
Biólogo

Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JR**

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

Piracicaba
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, pela orientação e confiança depositada em mim durante nosso convívio (*in memoriam*);

Ao meu orientador Prof. Dr. Italo Delalibera Jr pelo acompanhamento, suporte, disponibilidade e orientação durante o desenvolvimento do meu trabalho;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP) pelas oportunidades e conhecimentos oferecidos;

Aos Drs. Rogério B. Lopes e Luis F.A. Alves pelo auxílio na elaboração e desenvolvimento do projeto;

A bióloga Solange Aparecida Vieira Barros, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pela amizade e assistência na condução dos experimentos;

A todos os colegas de laboratório, em especial aos amigos Gabriel M. Mascarin, Giuliano Pauli, Janayne M. Rezende e Thiago Mastrangelo pela amizade sincera e ajuda durante o mestrado;

A minha família, pelo suporte e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida;

A minha noiva Janaina, por além de auxiliar na execução dos meus experimentos, ser tão maravilhosa e imprescindível pra mim;

As bibliotecárias Eliana e Silvia pela ajuda na formatação da dissertação;

A Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de estudos e confiança investida em meu trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 9
1 INTRODUÇÃO 11
Referências 21
2 PROTOCOLO PARA A AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NA FORMA DE CONÍDIOS SECOS E FORMULADOS EM ÓLEO EMULSIONÁVEL 29
Resumo 29
Abstract 29
2.1 Introdução 30
2.2 Material e Métodos 32
2.2.1 Método de avaliação da viabilidade 33
2.2.2 Método para produtos formulados a base de óleo emulsionável 34
2.2.3 Método para suspensão de aplicação ("calda") preparada com formulações em óleo emulsionável 35
2.2.4 Definição de parâmetros do método de avaliação da viabilidade 35
2.2.4.1 Seleção do meio de cultura para as análises de viabilidade 35
2.2.4.2 Influência de antibiótico na germinação dos conídios 36
2.2.4.3 Influência de fungistáticos na germinação dos conídios 36
2.2.4.4 Análises estatísticas 37
2.2.5 Validação do método de avaliação da viabilidade 37
2.2.5.1 Comparação de dois métodos de avaliação direta de viabilidade 38
2.2.5.2 Comparação dos métodos de viabilidade direta e Unidades Formadoras de Colônia 39
2.2.5.3 Comparação dos métodos de viabilidade direta e viabilidade por Fluorescência 39
2.2.5.4 Análises estatísticas 40
2.3 Resultados 41
2.3.1 Seleção do meio de cultura para as análises de viabilidade 41
2.3.2 Influência do antibiótico na germinação dos conídios 42
2.3.3 Influência de fungistáticos na germinação dos conídios 43

2.3.4 Comparação de dois métodos de avaliação direta de viabilidade 45
2.3.5 Comparação dos métodos de viabilidade direta e Unidades Formadoras de Colônia 49
2.3.6 Comparação dos métodos de viabilidade direta e viabilidade por Fluorescência.....51
2.4 Discussão 53
Referências.....58
3 EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO NA VIABILIDADE E VIRULÊNCIA DOS FUNGOS *BEAUVERIA BASSIANA* E *METARHIZIUM ANISOPLIAE* NA FORMA DE CONÍDIOS SECOS NÃO FORMULADOS E FORMULADOS 62
Resumo 62
Abstract 62
3.1 Introdução 63
3.2 Material e Métodos 65
3.2.1 Efeito do período de exposição e da temperatura na viabilidade e virulência da suspensão de aplicação (“calda”) 65
3.2.2 Curva de sobrevivência ao longo do tempo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de conídios puros ou formulados em óleo emulsionável.....66
3.2.3 Análises estatísticas.....67
3.3 Resultados 67
3.3.1 Efeito do período de exposição e da temperatura na viabilidade e virulência da suspensão de aplicação do fungo *Beauveria bassiana* 67
3.3.2 Efeito do período de exposição e da temperatura na viabilidade e virulência da suspensão de aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* 72
3.3.3 Curva de sobrevivência ao longo do tempo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de conídios puros ou formulados em óleo emulsionável.....76
3.4 Discussão 78
Referências.....82
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 89

RESUMO

Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável

Este trabalho teve o objetivo de avaliar, em condições de laboratório, a influência da temperatura e do tempo de exposição na viabilidade e virulência dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em suspensões preparadas com produtos à base de Conídios puros, Arroz+fungo e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável. Inicialmente foi necessário o desenvolvimento de um método eficiente e econômico para avaliação da viabilidade, especialmente para produtos formulados em óleo emulsionável misturados em água (suspensão de aplicação). Durante o desenvolvimento do método de avaliação foram definidos parâmetros e condições adequadas para cada formulação, como o meio de cultura, e também a influência de antibióticos e fungistáticos. O protocolo estabelecido baseia-se resumidamente no plaqueamento de 150 µL de uma suspensão contendo entre 0,7 e 1×10^6 conídios/mL em placas tipo Rodac® com 5 mL de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar + 5 mg/L de Pentabiótico® e 10 µL/L de Derosal® (Carbendazim), efetuando-se posteriormente a contagem dos conídios germinados. Este método foi comparado com outra técnica de viabilidade direta (VD) e com as técnicas de Unidade Formadoras de Colônia (UFC) e viabilidade por fluorescência, confrontando-se a precisão obtida pelo coeficiente de variação (CV) das análises de cada método. Os resultados demonstraram que além da facilidade de execução, o método desenvolvido apresentou maior precisão que as demais técnicas (com CV até 7 vezes menor em relação à VD, e até 32 vezes menor que UFC). Foi constatado que a técnica de UFC não é adequada para avaliações de produtos formulados, visto que em relação à quantificação inicial subestimou a concentração viável na maioria das formas dos fungos testadas, sendo que nos produtos em óleo emulsionável estes valores foram 54% menores para *B. bassiana*, e 73% menores para *M. anisopliae*. A técnica para avaliação da viabilidade da suspensão preparada com produtos formulados em óleo se mostrou eficaz, após a retirada do óleo da suspensão e outras adaptações. Suspensões de produtos e formulações a base de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram mantidas a 26°C, 36°C e 46°C por 1h, 4h e 6h e os efeito destes tratamentos foram medidos na viabilidade e virulência dos fungos contra lagartas de *Diatraea saccharalis*. Verificou-se que quanto maior o tempo de exposição e maior a temperatura, maior é a influência negativa nos parâmetros dos fungos. Entretanto, a formulação em óleo emulsionável foi a que apresentou melhor proteção aos efeitos detrimentais da temperatura. Mesmo após 6h de exposição a temperatura de 36°C a viabilidade se manteve acima dos 85% para ambos os fungos avaliados. Esta formulação também apresentou os melhores resultados de mortalidade dos insetos, e mesmo após 4h de exposição a 46°C atingiu 39% e 50% de eficiência para *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente, sendo recomendável para o controle de *D. saccharalis*. O protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos proposto constitui-se como uma ferramenta importante para estudos da influência de fatores bióticos e abióticos durante o período de pré-aplicação na eficiência de micoinseticidas.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis*; Cana-de-açúcar; Formulação em óleo; Fungos entomopatogênicos; Viabilidade direta

ABSTRACT

Establishment of a protocol to evaluate the conidial viability of entomopathogenic fungi and determination of heat protection to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by emulsifiable oil formulation

This study aimed to evaluate, under laboratory conditions, the influence of temperature and exposure time on the viability and virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in suspensions prepared with pure conidia, rice plus fungus and in formulations of wettable powder and concentrated suspension in emulsifiable oil. Initially, an efficient and economical methodology was developed to evaluate conidia viability for each formulation, especially for products formulated in emulsifiable oil mixed in water (suspension of application). During the development of the methodology, the influence of culture media, antibiotics and fungistatics and appropriate conditions were defined for each formulation. Briefly, the established protocol was based on plating 150 µL of suspensions containing between 0.7 and 1×10^6 conidia/mL on a plate type Rodac® with 5 ml of Potato Dextrose Agar culture medium plus 5 mg/L pentabiotic® and 10mg/L and 10 µL/L Derosal® (Carbendazim) and the subsequent counting of germinated conidia. This method was compared to a direct counting (DC) technique, the technique of colony-forming unit (CFU) and viability through fluorescence. The precision of each methodology was measured by their coefficient of variability (CV). Besides its easiness of execution, the new developed methodology was the most precise of all methods (with CV up to 7 times lower compared to the DC, and up to 32 times lower than the UFC). Our results showed that the technique of UFC is not appropriate for evaluation of formulated products, as compared to the conidial quantification by hemacytometer, this technique underestimated the viable concentration in most forms of fungi tested, and for the products in emulsifiable oil these values were 54% lower for *B. bassiana*, and up to 73% lower for *M. anisopliae*. The technique for assessing the viability of the suspension prepared with products formulated in emulsifiable oil was effective, after the removal of oil from the suspension and others adaptations. The effect of temperature and period of time on conidia viability of *B. bassiana* and *M. anisopliae*-based products and formulations and their virulence against larvae of *Diatraea saccharalis* was measured at 26°C, 36°C and 46°C for 1h, 4h and 6h. The longer the time of heat exposure and the higher the temperature, the greater the negative influence on vital parameters of the fungi. However, the emulsifiable oil formulation was the least affected by the detrimental effects of heat for both fungi. Even after 6 hours of exposure to temperature of 36°C, the viability remained above 85% for both species evaluated. This formulation also showed the best results of insect mortality, and even after 4h of exposure to 46°C the efficiency was 39% (for *B. bassiana*) and 50% (for *M. anisopliae*), and therefore can be useful for control of *D. saccharalis*. The proposed protocol of evaluation of entomopathogenic fungi viability is a valuable tool for studies of biotic and abiotic factors effect on efficiency of micoinsecticides during the pre-application period.

Keywords: *Diatraea saccharalis*; Sugarcane; Oil formulation; Entomophatogenic fungi; Direct counting

1 INTRODUÇÂO

Com uma área plantada em 2008 de 8,5 milhões de hectares, a cana-de-açúcar teve aumento de 13,9% em relação à safra de 2007, com a produção de 571,4 milhões de toneladas. Para o ano de 2009 acredita-se que a safra será recorde, com a colheita de 633,7 milhões de toneladas. Desse total, estima-se que 44,7% serão destinados à fabricação de açúcar e 55,3% à produção de álcool, de acordo com o último levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento concluído em abril deste ano. (CONAB, 2009).

No entanto, este aumento da área plantada de cana-de-açúcar, e conseqüente crescimento da produção, trazem conseqüências principalmente no que se diz respeito às pragas desta cultura. Até meados da década de 1990, a cigarrinha-da-raíz (*Mahanarva fimbriolata* Stäl.) (Hemiptera: Cercopidae), era praga de pouca importância para a cana-de-açúcar no estado de São Paulo, já que a queima da palha antes da colheita reduzia drasticamente as suas populações, principalmente pela destruição dos ovos em diapausa, dentre outros fatores. No entanto, com o incremento das áreas de colheita de "cana crua" no estado e em outros locais da região Centro-Sul do país, as populações de cigarrinha aumentaram rapidamente, beneficiadas pelo acúmulo de palhada depositada sob o solo, proporcionando temperaturas favoráveis e aumento da umidade no solo, e pela não destruição destes ovos diapáusicos (DINARDO-MIRANDA, 2004). A adoção do corte mecanizado da cana-de-açúcar resulta também no aumento de outros insetos-praga como a cigarrinha-das-folhas (*Mahanarva posticata* Stäl.) (Hemiptera: Cercopidae), a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis* F.) (Lepidoptera: Crambidae), a broca-gigante-da-cana (*Telchin licus licus* Drury) (Lepidoptera: Castiniidae) e também algumas pragas de solo (ALMEIDA; BATISTA-FILHO; SANTOS, 2003; DINARDO-MIRANDA et al., 2000).

Visando ao controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar muitas usinas fazem uso do controle biológico, com o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae). O uso de *M. anisopliae* iniciou-se no Nordeste do país há muito tempo para o controle da cigarrinha-das-folhas *M. posticata*, chegando este a ser aplicado em uma área de um milhão de hectares. Estima-se que o fungo seja utilizado atualmente em mais de 600 mil hectares para o controle das cigarrinhas *M. fimbriolata* e *M. posticata* em todo país, constituindo-se como a principal forma de controle destes insetos (ALVES et al.; 2008a).

Testes em campo comprovaram a eficiência da linhagem ESALQ-1037 de *M. anisopliae* na redução populacional da cigarrinha-da-raíz, atingindo até 80% de mortalidade, dependendo das condições ambientais (ALVES et al., 2007; LOPES et al., 2002).

A broca-da-cana, *D. saccharalis* considerada a principal praga da cultura, ocorre em todas as áreas onde se planta cana-de-açúcar no mundo. As lagartas causam danos diretos ao colmo, abrindo galerias que resultam em perda de peso da cana, provocando também morte das gemas e ocasionando falhas na germinação. De acordo com resultados de pesquisas sobre o prejuízo causado pela broca, 1% de infestação da praga causam perdas de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso (GALLO et al., 2002).

O controle químico de *D. saccharalis* pode ser realizado por meio da pulverização de inseticidas juvenóides, como Triflumuron ou Lufenuron ou por inseticidas sistêmicos, como o fipronil. Porém, o principal método de controle é o biológico, por meio do himenóptero *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), introduzido no Brasil em 1974, sendo utilizado hoje em cerca de 1.700.000 hectares, num programa de controle biológico difícil de ser superado em todo o mundo, pela sua eficiência e pela extensão coberta (PARRA, 2008, informação pessoal[1]). Nos últimos anos, esse parasitóide evitou perdas de até 100 milhões de dólares por ano, sendo 20 milhões só em São Paulo, reduzindo a infestação da praga de 10% para 2% (GALLO et al., 2002).

O parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* (Zucchi) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) também tem sido usado no controle da broca, obtendo-se até 60% de controle quando associado à *C. flavipes*, sendo liberado hoje em cerca de 150.000 hectares (PARRA, 2008, informação pessoal[1]).

Além disso, existe o potencial do uso dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) e *M. anisopliae* para o controle de *D. saccharalis* segundo Alves (1998). Esses fungos são patogênicos para todos os estágios de desenvolvimento da broca, sendo altamente eficientes para ovos de um a dois dias de idade. Em experimentos realizados por este autor em condições de campo, foi constatada a infecção de 58% de lagartas por *M. anisopliae* e 44% por *B. bassiana*, após aplicações de 10^{13} conídios/ha.

Outra praga, que recentemente vem preocupando os produtores pela capacidade de dano é a broca-gigante-da-cana, que teve sua primeira ocorrência registrada no estado de São Paulo em

[1] PARRA, J.R.P. Escola Superior de agricultura 'Luiz de Queiroz'.

julho de 2007. Dentre as formas de controle testadas até o momento, o fungo *B. bassiana* têm se mostrado como uma alternativa viável para o controle desta praga (MARQUES et al., 2008). Assim, ressalta-se que embora existam as particularidades regionais, as principais pragas da cultura da cana-de-açúcar são controladas com alternativas biológicas, seja por meio de insetos ou patógenos (ALVES et al., 2008b).

Os fungos entomopatogênicos a despeito de ocupar apenas 10% do mercado mundial de biopesticidas, são os agentes de controle microbiano mais utilizados na América Latina, sendo que *B. bassiana* e *M. anisopliae* representam mais de 60% deste mercado (33% e 32% respectivamente) (FARIA; WRAIGHT, 2007). Porém, no Brasil, apesar de existirem muitos produtos sendo comercializados, apenas dois são registrados no ministério da agricultura, sendo um produto a base de *B. bassiana* e outro de *M. anisopliae*, ambos da mesma empresa privada. Os fungos utilizados são produzidos, a grande maioria, por laboratórios setoriais de associações de produtores, centros de pesquisa, órgãos federais, e no caso específico da cana-de-açúcar em unidades instaladas nas próprias usinas, com sistemas de produção predominantemente artesanais (ALVES et al.; 2008b; THAKORE, 2006).

O baixo custo de produção e a simplicidade do processo de produção usado favoreceram a rápida difusão do controle microbiano na cultura, mas por outro lado estes fatores têm restringido a oportunidade de mercado para produtos mais eficientes e com maior nível tecnológico, como por exemplo a expansão do uso de produtos formulados. Também existe muita desinformação a respeito dos benefícios das formulações. As empresas preferem continuar no sistema de produção já conhecido e não arriscam investir em equipamentos, novas tecnologias, e treinamento de mão-de-obra para se produzir uma formulação, pela incerteza da aceitação dos produtores quanto aos benefícios dos produtos formulados em relação aos que já estão no mercado (ALMEIDA et al.; 2008).

Por causa desta realidade, muito pouco se investe em pesquisas de formulações, o que faz com que a grande maioria do fungo utilizado em cana-de-açúcar, produzido tanto pelas usinas ou pelas empresas privadas de biopesticidas seja na forma de Arroz+Fungo não formulado, necessitando assim de refrigeração no armazenamento.

Entretanto, é possível encontrar no mercado alguns produtos formulados ou semiformulados. Os produtos a base de fungos entomopatogênicos comercializados no Brasil são encontrados na forma de Conídios Puros (Esporo Puro) e Arroz+Fungo (fungo mais o substrato,

que alguns consideram como Grânulo), e nas formulações Pó-seco, Pó-molhável (WP) e Suspensão concentrada emulsionável (SC), sendo que o Arroz+Fungo compreende mais de 90% do total utilizado no país (ALVES et al.; 2008c; BATISTA-FILHO et al., 1998; FARIA; WRAIGHT, 2007).

A qualidade destes fungos produzidos no Brasil é bastante variável. Assim, podem ser encontrados no mercado produtos excelentes com ótimos padrões de concentração, viabilidade, pureza e genética do patógeno, e ao mesmo tempo, outros de péssima qualidade, sem padronização e com altos níveis de contaminações (ALVES et al., 2008c). Isto é agravado pelo fato de que a grande maioria dos produtos no Brasil não é registrada, e também por não existir ainda legislações específicas para produtos microbianos.

Uma característica essencial da produção de todos os agentes de controle biológico é um método eficaz de controle de qualidade. Mesmo com um sistema simples de produção com baixo nível tecnológico é possível se obter produtos com alta qualidade, desde que as medidas de controle de qualidade sejam rigorosas. Isto ajuda a maximizar a eficiência do produto, garantir a segurança ao ambiente, padronizar os custos de produção aumentando assim, a confiança no método de controle (JENKINS; GRZYWACZ, 2000).

Segundo recomendações propostas por Alves e Pereira (1998) e Jenkins e Grzywacz (2000) um bom sistema de controle de qualidade possui os seguintes procedimentos: 1) Cuidados na manutenção da cultura e preservação do patógeno (Identificação exata e caracterização do isolado, técnica de armazenamento adequada para preservação do isolado original, produção feita a partir do isolado da cultura estoque); 2) Monitoramento das contaminações (Sanidade), com o controle do material utilizado na produção, avaliação de amostras em estágios críticos da produção, quantificação e controle dos contaminantes no produto final (Pureza); 3) Controle de condições da produção (Temperatura, umidade final, aeração); 4) Concentração do produto; 5) Viabilidade do produto; 6) Agressividade (Virulência/Potência); 7) Quantidade de organismos infectivos viáveis por grama de produto final.

Infelizmente nem todos os órgãos que produzem fungos entomopatogênicos, sejam eles empresas ou laboratórios de usinas, apresentam um sistema rigoroso como este citado. Para Alves et al. (2008c) e Jenkins e Grzywacz (2000), a negligência no controle de qualidade dos produtos ainda é o principal fator que limita o avanço do controle microbiano.

O monitoramento da qualidade conduzido pelas empresas se restringe aos cuidados mínimos com assepsia durante o processo (sem os quais se torna impossível produzir fungos), a quantificação de propágulos para se obter a concentração final, e também é feita a avaliação da viabilidade do produto.

A viabilidade medida pela porcentagem de germinação do fungo interfere diretamente na ação do patógeno visto que denota a quantidade de propágulos vivos que podem vir a desencadear o processo infectivo. Talvez esse seja o motivo que leve os produtores de fungos entomopatogênicos a considerar a viabilidade o parâmetro mais importante na qualidade dos produtos. Entretanto, ainda não existe um protocolo padrão para testes de viabilidade de conídios ou protocolos para utilização no controle de qualidade das empresas. Embora seja difícil estabelecer um único método que se aplique a realidade de todas estas biofábricas (JENKINS; GRZYWACZ, 2000; JIMENEZ; GILLESPIE, 1990), é necessário que sejam estabelecidos padrões e recomendações a serem obrigatoriamente seguidos pelas empresas e regulados pelo governo federal para garantir a qualidade dos produtos em benefício dos consumidores.

A padronização de testes de viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos é muito importante também para as pesquisas científicas na área, pois este tem sido o parâmetro utilizado para se estudar os efeitos de fatores bióticos e abióticos sobre os fungos em condições de laboratório e campo, tais como a influência da radiação solar, desidratação e estresse hídrico, umidade, chuvas, temperaturas extremas, estresse nutricional, PH, embebição de conídios, etc (BRAGA et al., 2001; DEVI et al., 2005; FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009; HALLSWORTH; MAGAN, 1999; INGLIS et al., 2000; JACKSON et al., 1991; LAZZARINI; ROCHA; LUZ, 2006; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2004; RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2004; ZIMMERMAN et al., 1982). Basicamente, existem duas formas de se quantificar o número de conídios viáveis de fungos entomopatogênicos, a contagem indireta e a contagem direta, sendo que ambas apresentam limitações.

No método de contagem indireta, são preparadas diluições seriadas de uma suspensão original dos fungos (de 5 a10 diluições), fazendo-se o espalhamento uniforme de 0,1 mL de cada tubo em no mínimo 2 placas com meio de cultura nutritivo contendo ágar (semi-sólido) por diluição. Após se incubar pelo período adequado para cada fungo, pelo menos 5 dias, quantifica-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por placa e com base na diluição utilizada calcula-se o número de conídios viáveis por mL da suspensão original (ALVES; MORAES, 1998;

GOETTEL; INGLIS, 1997). Trabalhos científicos com fungos entomopatogênicos dificilmente utilizam esta técnica para avaliação de viabilidade, somente no caso para avaliações da presença de fungos em substratos (SHIMAZU; MAEHARA; SATO, 2002), contudo muitas empresas adotam este procedimento por proporcionar a quantificação de conídios viáveis e a porcentagem de contaminantes de uma só vez, podendo ser utilizada para fungos presentes em substratos ou com resíduos de produção (sujeira), além de não requerer grande conhecimento técnico e/ou uso de um microscópio.

Porém, esta técnica é laboriosa e consome muito tempo e material, sendo muitas vezes imprecisa. É bastante influenciada por erros na pesagem, pois o resultado está diretamente ligado à quantidade da amostra utilizada, além disso, após realizarem-se as diluições seriadas e o plaqueamento, os conídios que permanecem unidos podem formar apenas uma colônia, subestimando o resultado final (GOETTEL; INGLIS, 1997; JENKINS; GRZYWACZ, 2000; MAGALHÃES; FARIA; FRAZÃO, 1997; STENTELAIRE et al., 2001).

Para o método de contagem direta existem algumas variações ou adaptações que são encontradas na literatura. De maneira geral, faz-se o plaqueamento de 0,1 mL de uma suspensão de conídios em um meio de cultura nutritivo contendo ágar (semi-sólido), espalhando a suspensão com alça de Drigalski. Os conídios viáveis e não viáveis são então contados sob um microscópio de luz no aumento de 400× após a incubação por tempo e temperatura pré-determinados. Para a contagem, a placa é dividida em quatro campos, e em cada um destes é realizada a contagem em três visadas aleatórias, sendo o resultado dado em porcentagem de viabilidade dos conídios (ALVES; PEREIRA, 1998; GOETTEL; INGLIS, 1997).

Este método é mais preciso, mais rápido e menos oneroso do que o indireto, porém apresenta a desvantagem em relação ao método de UFC de ter que se utilizar uma outra técnica para a quantificação da suspensão (em Hemacitômetro segundo ALVES; PEREIRA, 1998). Podem-se citar também, o problema que normalmente existe com a ‘escolha’ de campos para contagem, que torna a avaliação mais imprecisa, e a dificuldade de se estabelecer o tempo de incubação, o qual influencia diretamente no resultado final. Outras carências apontadas para o método direto são a desuniformidade no plaqueamento, e também a necessidade de adaptação, no caso de alguns microscópios, para o encaixe das placas que serão visualizadas.

Algumas adaptações foram propostas com o objetivo de uniformizar a germinação de diferentes isolados para contornar o problema da variabilidade no tempo de incubação, e reduzir o risco de haver um crescimento acentuado das hifas, o qual dificulta a separação dos conídios germinados e não germinados. Por exemplo, Milner; Huppatz e Swaris (1991) avaliaram os efeitos do fungicida seletivo Benlate (Benomyl, Du Pont®) quando acrescido ao meio de cultura, na viabilidade do fungo *M. anisopliae*. Devido às propriedades fungistáticas deste produto, os fungos podem permanecer incubados por muito mais tempo após o início da germinação, permitindo estudos comparativos entre diferentes isolados, inclusive para alguns isolados que apresentam dormência, ou até mesmo avaliar uma mesma amostra em tempos diferentes. O fungicida propicia uma germinação mais sincronizada cessando o crescimento excessivo dos tubos germinativos e das hifas, permitindo que as avaliações sejam conduzidas após um período mais longo. Esta recomendação melhora muito as condições de avaliação e tem sido adotada por muitos pesquisadores desde então.

Para contornar o problema da desuniformidade do espalhamento com a alça de Drigalski, Alves[2] (2009, informação pessoal) recomenda o plaqueamento de 0,3 mL da suspensão de conídios na superfície do meio de cultura, agitando-se a placa vigorosamente em todas as direções para espalhar a suspensão, sem a necessidade do uso da alça, o que torna o processo mais rápido e uniforme. Isto melhora as condições para avaliação, pois permite um espalhamento menos variável, e facilita a contagem no momento da análise, desde que os campos sejam estabelecidos de maneira aleatória.

Outra técnica que visa a melhorar o espalhamento e as condições de avaliação foi proposta por Magalhães; Faria e Frazão (1997). A técnica consiste em se transferir pequenos blocos de meio de cultura (1×1×0,2 cm) para lâminas de vidro, inoculando-se 10 µL da suspensão fúngica e cobrindo-se com lamínulas. Após a incubação, a avaliação é feita contando-se no mínimo 400 conídios por lâmina. Este método parece ser bem interessante, visto que além de eliminar o problema de espalhamento, permite que a avaliação seja feita em qualquer microscópio, sem a necessidade de modificações para o encaixe das placas. Neste caso, também é importante evitar a seleção de campos de contagem, correndo a lâmina de uma extremidade à outra para fazer a contagem dos conídios viáveis e não viáveis.

---

[2] ALVES, R.T. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Cerrados

Consideradas também como avaliações diretas (GOETTEL; INGLIS, 1997), existem as técnicas chamadas de *Vital stain*, nas quais são usados corantes ou substâncias que reagem evidenciando somente os conídios viáveis, ou somente os inviáveis, sem a necessidade de incubação prévia. É o caso dos fluorocromos diacetato de fluoresceína (DAF) e iodeto de propídio (IP), que coram células vivas (verde) e mortas (vermelho), respectivamente (BUTT, 1997).

Esta técnica tem sido utilizada por alguns autores (DELALIBERA JR.; HUMBER; HAJEK, 2004; FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990; JONES; SENFT, 1985; SCHADING; CARRUTHERS; MULLIN-SCHADING, 1995), para avaliação da viabilidade de fungos entomopatogênicos. No entanto, apesar de fornecer uma avaliação mais rápida da viabilidade dos conídios, esta técnica é mais cara do que as demais, difícil de utilizar para um grande número de avaliações que tenham que ser realizadas em um curto espaço de tempo, pois o corante perde a ação rapidamente, e pode não ser adequada para todos os tipos de fungos (FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990; JIMENEZ; GILLESPIE, 1990). Além disso, basicamente só pode ser usada com conídios puros, não sendo aplicável a alguns tipos de produtos formulados, e também requer um maior cuidado na manipulação, pois os fluorocromos são altamente tóxicos.

Mesmo com a existência de vários métodos para testar a viabilidade de conídios, pouco foi estudado sobre a eficiência destes protocolos para determinação da viabilidade de fungos entomopatogênicos em produtos formulados, principalmente para análises de produtos em óleo. Desta forma, estudos são necessários para o desenvolvimento de novos protocolos ou para aperfeiçoar o método de viabilidade direta, que é o mais amplamente utilizado, para que este possa ser empregado em análises de produtos formulados desta maneira. Neste sentido, Daoust; Ward e Roberts (1983) sugerem em seu trabalho alguns passos prévios à técnica direta de avaliação da viabilidade de fungos quando formulados em óleo, sendo o mais importante a centrifugação para a retirada do excesso de óleo antes do plaqueamento. O método de Magalhães; Faria e Frazão (1997) descrito anteriormente, também é recomendado pelos autores para as análises de produtos formulados em óleo, utilizando-se os cubos de meio de cultura em lâminas da mesma forma já apresentada.

Outra necessidade é o desenvolvimento de um método para avaliar a viabilidade de produtos formulados em óleo quando estes já se encontram misturados em água, ou seja, a chamada ‘calda’ (suspensão de aplicação), visto que não se encontra na literatura nenhuma

referência específica para este caso. Isto tornaria possível a avaliação do efeito de fatores que influenciam a eficiência dos fungos em campo, no período entre a preparação da calda e a aplicação, estabelecendo-se assim parâmetros e recomendações precisas a serem seguidas pelos produtores no momento da aplicação.

Estudos neste sentido são muito importantes, pois apesar da boa eficiência apresentada pelos fungos entomopatogênicos, sua eficácia em campo é extremamente dependente das condições ambientais (ALVES, 1998; ZIMMERMAN et al., 1982). Dos muitos fatores abióticos que podem afetar a sobrevivência e a capacidade infectiva destes fungos, a radiação solar, umidade relativa e temperatura são consideradas os mais importantes (BUGEME et al., 2008; INYANG et al, 2000). Por este motivo, vários estudos foram conduzidos para determinar os efeitos de fatores abióticos nos parâmetros biológicos dos fungos *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* em condições de laboratório e campo (BRAGA et al., 2001; BROOKS et al., 2004; BUGEME et al., 2009; DEVI et al., 2005; FARGUES et al., 1996; FERNANDES et al., 2008; HALLSWORTH; MAGAN 1999; HUANG; FENG, 2009; INGLIS; JOHNSON; GOETTEL, 1997; LAZZARINI, ROCHA; LUZ, 2006; MORLEY-DAVIES; MOORE; PRIOR, 1996; OUEDRAOGO et al., 1997; PERFETTI; MORENO; QUINTERO, 2007; RANGEL et al., 2004; SOSA-GOMEZ; ALVES, 2000; THOMPSON; BRANDENBURG; ARENDS, 2006;YEO et al., 2003; ZIMMERMAN et al., 1982).

Uma forma de melhorar o desempenho dos fungos, aumentando a resistência às condições abióticas detrimentais é por meio da formulação do produto. Os ingredientes usados nas formulações podem também melhorar a dispersão na aplicação e aumentar o tempo de prateleira (BATISTA-FILHO et al., 1998). A formulação em óleo é a que tem apresentado os melhores resultados de proteção para muitos dos fatores já citados, mas principalmente para a radiação solar UV (ALVES et al., 1998; HEDIMBI et al., 2008; INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1995; MOORE et al., 1993) e para temperatura (DAOUST; ROBERTS, 1983; McCLATCHIE et al., 1994; STARTHERS; MOORE; PRIOR, 1993). Porém, esta proteção à temperatura tem sido estudada somente com fungos na forma de produtos puros em óleo, e não quando estes se encontram misturados na água para aplicação.

Assim, acredita-se que a temperatura do ambiente externo e consequentemente da água em que o fungo se encontra, pode agir inviabilizando os conídios, e prejudicando a efetividade do patógeno. O tempo em que o fungo fica suspenso antes da aplicação também pode interferir

indiretamente, pois os conídios ficarão mais expostos às condições de temperatura. É possível que quando formulados em óleo, estes conídios apresentem maior resistência ao aumento da temperatura na suspensão de aplicação do que na forma de conídios puros, arroz+fungo ou na formulação pó-molhável. Estas questões científicas foram investigadas e os resultados apresentados nos capítulos a seguir.

Referências

ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; BATISTA-FILHO, A.; LEITE, L.G.; NEVES, P.M.O.J. Formulação de entomopatógenos na América Latina. In: S.B. ALVES; R.B. LOPES, **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 10, p. 257-272.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA-FILHO, A.; SANTOS, A.S. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de Cana-de-Açúcar e diferentes épocas de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 101-103, 2003.

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, n. 8, p. 675-679, 1998.

ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos. In: _____ **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-381.

ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATISTA-FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E.J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina:** avanços e Desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008c. cap. 8, p. 215-238.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; VIEIRA, S.A. Efeito de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* na proteção à radiação e eficiência no controle de *Mahanarva fimbriolata*. In: SICONBIOL - SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10, 2007, Brasília. **Anais eletrônicos...** Brasília, 2007. 1 CD-ROM.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; PEREIRA, R.M.; TAMAI, M.A. O controle microbiano na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina:** avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008a. cap. 1, p. 23-48.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina:** avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008b. cap. 3, p. 69-110.

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 23, p. 765-778.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 27, p. 845-870.

BATISTA-FILHO, A.; ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; PEREIRA, R.M.; AUGUSTO, N.T. Formulação de Entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 31, p. 917-966.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae.* **Mycological research**, Cambridge, v. 105, n. 7, p. 874-882, 2001.

BROOKS, A.J.; MURO, M.A.; BURREE, E.; MOORE, D.; TAYLOR, M.A.; WALL, R. Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis*: effects of temperature and formulation. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, p. 1043–1049, 2004.

BUGEME, D.M.; KNAPP, M.; BOGA, H.I.; WANJOYA, A.K.; MANIANIA, N.K. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 167, p. 221–227, 2009.

BUGEME, D.M.; MANIANIA, N.K.; KNAPP, M.; BOGA, H.I. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to Tetranychus evansi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, p. 275–285, 2008.

BUTT, T.M. Complementary techniques: Fluorescence microscopy. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**, San Diego: Academic Press, 1997. chap. 8-2, p. 355-366.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento abril/2009**. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 2009. 15p.

DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 143-150, 1983.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of Formulation on the Viability of *Metarhizium anisopliae* Conidial. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 151-160, 1983.

DELALIBERA JR., I.; HUMBER, R.A.; HAJEK, A.E. Preservation of in vitro cultures of the mite pathogenic fungus *Neozygites tanajoae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 579-586, 2004.

DEVI, U.K.; SRIDEVI, V.; MOHAN, C.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, p. 181–189, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Influência das cigarrinhas das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar e Álcool**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 34-35, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; FERREIRA, J.M.G.; GARCIA JR., C.A; COELHO, A.L.; GIL, M.A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no Controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em Cana-de-Açúcar. **Neotroprical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 91-98, 2004.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 135, p. 171-181, 1996.

FARIA, M.R.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 346–354, 2009.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237–256, 2007.

FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, p. 69–78, 2008.

FIRSTENCEL, H.; BUTT, T.M.; CARRUTHERS, R.I. A Fluorescence microscopy method for determining the viability of Entomophthoralean fungal spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 258-264, 1990.

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.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Pragas das plantas e seu controle. In: _____ **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. cap. 12, p. 397-912.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**, San Diego: Academic Press, 1997. chap. 5-3, p. 213-250.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and Temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 261–266, 1999.

HEDIMBI, M.; KAAYA, G.P.; SINGH, S.; CHIMWAMUROMBE, P.M.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, p. 149–156, 2008.

HUANG, B.F.; FENG, M.G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 168, p. 145–152, 2009.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungos, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 581-590, 1995.

INGLIS, G.D.; IVIE, T.J.; DUKE, M.G.; GOETTEL, M.S. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 55–64, 2000.

INGLIS, G.D.; JOHSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Sympodulosporae) of grasshoppers under Field conditions. **Environmental Entomology**, College Park, v. 26, n. 2, p. 400–409, 1997.

INYANG, E.N.; MCCARTNEY, H.A.; OYEJOLA, B.; IBRAHIM, L.; PYE, B.J.; ARCHER, S.A.; BUTT, T.M. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 653-661, 2000.

JACKSON, A.M.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 494-501, 1991.

JENKINS, N.E.; GRZYWACZ, D. Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents-Assurance of Product Performance. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, p. 753-777, 2000.

JIMENEZ, J.; GILLESPIE, A.T. Use of the optical brightener Tinopal BOPT for the rapid determination of conidial viabilities in entomogenous deuteromycetes. **Mycological research**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 279-283, 1990.

JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetato-propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 33, p. 77-79, 1985.

LAZZARINI, G.M.J.; ROCHA, L.F.N.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological research**, Cambridge, v. 110, p. 485–492, 2006.

LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; ALVES, S.B. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., 2002, Manaus. **Anais...** Manaus, 2002. p. 54.

MAGALHÃES, B.; FARIA, M.; FRAZÃO, H. A Technique to estimate the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) formulated in vegetable oil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, n.3, p. 569-572, 1997.

MARQUES, E.J.; LIMA, R.O R.; ANDRADE, R.M.; ARAUJO JR., J.M. Controle biológico das brocas *Diatraea spp*, *Telchin licus licus* e cigarrinhas *Mahanarva spp* em cana-de-açúcar". In: VENZON, M; JÚNIOR, T.J.P.; PALLINI., A. (Org.). **Avanços no Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG-CTZM, v. Único, 2008, p. 95-111

McCLATCHIE, G.V.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations**. Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 7, p. 749-756, 1994.

MILNER, R.J.; HUPPATZ, R.J.; SWARIS, S.C. A New method for assessment of germination of *Metharizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 57, p. 121-123, 1991.

MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium favoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, p. 605-616, 1993.

MORLEY-DAVIES, J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures **Mycological research**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 31-38, 1995.

OUEDRAOGO, A.; FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; LOMER, C.J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride.* **Mycopathologia**, Den Haag, v. 137, p. 37–43, 1997.

PERFETTI, D.J.C; MORENO, P.M.; QUINTERO, M.E.A. Efectos de gradientes térmicos, salinos y pH sobre la germinación in vitro de un aislado nativo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, patógeno para *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*. **Revista Científica FCV-LUZ**, Maracaibo, v. 17, n. 6, p. 627-631, 2007.

RANGEL, D.E.N; ALSTON, D.G.; ROBERTS, D.W. Effects of physical and nutritional stress conditions during conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological research**, Cambridge, v. 112, p. 1355–1361, 2008.

RANGEL, D.E.N; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological research**, Cambridge, v. 112, p. 1362–1372, 2008.

RANGEL, D.E.N; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 87, p. 77-83, 2004.

SCHADING, R.L.; CARRUTHERS, R.I.; MULLIN-SCHADING, B.A. Rapid determination of conidial viability for entomopathogenic Hyphomycetes using fluorescence microscopy techniques. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 201-208, 1995.

SHIMAZU, M.; MAEHARA, N.; SATO, H. Density dynamics of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) introduced into forest soil, and its influence on other soil microorganisms. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 37, n. 2, p. 263–269, 2002.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 515-521, 2000.

STARTHERS, T.E.; MOORE, D.; PRIOR, C. The Effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, p. 111-115, 1993.

STENTELAIRE, C.; ANTOINE, N.; CABROL, C.; FERON, G.; DURAND, A. Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, p. 560–566, 2001.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial biotechnology**, Swansea, v. 2, p. 194-208, 2006.

THOMPSON, S.R.; BRANDENBURG, R.L.; ARENDS, J.J. Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 401–407, 2006.

YEO, H.; PELL, J.K.; ALDERSON, P.G.; CLARK, S.J.; PYE, B.J. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, p. 156–165, 2003.

ZIMMERMAN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 40, p. 36-40, 1982.

2 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NA FORMA DE CONÍDIOS SECOS E CONÍDIOS FORMULADOS EM ÓLEO EMULSIONÁVEL

Resumo

A técnica de viabilidade direta para determinação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos é de uso bastante difundido em estudos experimentais e análises de controle de qualidade de micoinseticidas. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações para avaliação de produtos formulados especialmente em óleo emulsionável. No presente trabalho, foram desenvolvidas adaptações nesta técnica com o objetivo de torná-la mais econômica e precisa, possibilitando também o seu uso na avaliação de produtos a base de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae,* formulados em óleo emulsionável e na calda de aplicação destes produtos. Durante o desenvolvimento do método de avaliação foram definidos parâmetros e condições adequadas para suspensões preparadas com produtos à base de Conídios puros, Arroz+fungo e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável. O protocolo estabelecido baseia-se resumidamente no plaqueamento de 150 µL de uma suspensão contendo entre 0,7 e 1×10^6 conídios/mL em placas tipo Rodac® com 5 mL de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar + 5 mg/L Pentabiótico® e 10 µL/L de Derosal® (Carbendazim) e posterior contagem dos conídios germinados. Este método foi comparado com outra técnica de viabilidade direta (VD) e com as técnicas de Unidade formadoras de colônia (UFC) e viabilidade por fluorescência, confrontando-se a precisão obtida pelo coeficiente de variação (CV) das análises de cada método. Os resultados demonstraram que além da facilidade de execução, o método desenvolvido apresentou maior precisão que as demais técnicas (com CV até 7 vezes menor em relação à VD, e até 32 vezes menor que UFC). Foi constatado que em relação à quantificação inicial, a técnica de UFC subestimou a concentração viável na maioria das formas dos fungos testadas, sendo que nos produtos em óleo emulsionável estes valores foram 54% menores para *B. bassiana*, e 73% menores para *M. anisopliae*. A técnica para avaliação da viabilidade da suspensão de produtos formulados em óleo se mostrou eficaz, após a retirada do óleo da suspensão e outras adaptações e constitui-se como uma ferramenta importante para estudos da influência de fatores bióticos e abióticos na eficiência de micoinseticidas.

Palavras - chave: *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; Viabilidade direta; Unidades formadoras de colônia; Diacetato de Fluoresceína

PROTOCOL FOR THE ASSESSMENT OF THE VIABILITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN DRY CONIDIA AND OIL-BASED EMULSIFIABLE FORMULATIONS OF CONIDIA

Abstract

The technique of direct assessment of viability of entomopathogenic fungal conidia is widely used in experimental studies and quality control analysis of mycoinsecticides. However, there are some limitations on this method with regard to evaluation of emulsifiable oil formulations. Thus, we have developed modifications of this technique in order to make it more

affordable and accurate, also allowing its use on the evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*-based oil formulation. Parameters and conditions were defined to assess the viability in suspensions with pure conidia, rice plus fungus and in formulations of wettable powder, and concentrated suspension in emulsifiable oil. The established protocol was based on platting of 150 µL of a 0.7 to 1×10^6 conidia/mL onto 5 mL of Potato-Dextrose-Agar culture media plus 5 mg/L Pentabiótico® plus 10 µL/L Derosal® in Rodac® plates and further counting of germinated spores. This methodology was compared to a direct viability (DC) technique, the techniques of colony-forming unit (CFU) and viability through fluorescence. The precision of each methodology was measured by their coefficient of variability (CV). Besides its easiness of execution, the new developed methodology was the most precise of all methods (with CV up to 7 times lower compared to the DC, and up to 32 times lower than the UFC). Our results showed that the technique of UFC is not appropriate for evaluation of formulated products, as compared to the conidial quantification by hemacytometer, this technique underestimated the viable concentration in most forms of fungi tested, and for the products in emulsifiable oil these values were 54% lower for *B. bassiana*, and up to 73% lower for *M. anisopliae*. The technique to evaluate conidia viability of oil formulations suspension was efficient, after removal of oil from suspension and other adaptations. The proposed protocol is a valuable tool for studies of biotic and abiotic factors effect on efficiency of mycoinsecticides.

Keywords: *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; Direct counting; Colony-forming units; Fluorescein diacetate

2.1 Introdução

O desenvolvimento de métodos baratos e rápidos, que possam ser utilizados como padrões para a avaliação da viabilidade de conídios/esporos de fungos é de grande interesse para um vasto campo de aplicações, especialmente para estudos com agentes de controle biológico de pragas (FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990; STENTELAIRE et al., 2001).

A viabilidade de conídios tem sido o principal método utilizado para determinar os efeitos de fatores ambientais, tais como radiação solar, desidratação e estresse hídrico, temperaturas extremas, PH, embebição de conídios, etc sobre os fungos entomopatogênicos, (DEVI et al., 2005; FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009; HALLSWORTH; MAGAN, 1999; JACKSON; WHIPPS; LYNCH, 1991; RANGEL et al., 2004; ZIMMERMAN et al., 1982). Também é utilizado pelos fabricantes de fungos, no Brasil e no mundo, para avaliar a qualidade dos produtos formulados e não formulados de fungos, principalmente dos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae). No entanto, ainda não há um protocolo padrão para testes de

viabilidade de conídios a ser utilizado pelos órgãos de pesquisa e pelas empresas no controle de qualidade de seus produtos (JENKINS; GRZYWACZ, 2000; JIMENEZ; GILLESPIE, 1990).

Diferentes métodos têm sido sugeridos, por exemplo, pela determinação da germinação com base na medição da atividade de enzimas desidrogenases por meio do uso de sais de tetrazólio, (SUTHERLAND; COHEN, 1983; MEIER; CHARVAT, 1993; STENTELAIRE et al., 2001), e também outras técnicas de coloração, como o uso combinado dos fluorocromos iodeto de propídio (IP) e diacetato de fluoresceína (DAF), analisando-se após o tratamento com estas substâncias, os conídios viáveis e inviáveis com o auxilio de um microscópio de fluorescência (FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990; SCHADING; CARRUTHERS; MULLIN-SCHADING, 1995). Esses métodos fornecem uma avaliação mais rápida da viabilidade dos conídios, mas são mais caros e difíceis de usar para um grande número de avaliações que tenham que ser realizadas em um curto espaço de tempo. Podem não ser adequados para todos os fungos, e basicamente só podem ser usados com Conídios puros, não sendo aplicáveis a alguns tipos de produtos formulados (FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990; JIMENEZ; GILLESPIE, 1990).

Alguns métodos simples e baratos podem ser usados, porém eles também apresentam algumas limitações e dificuldades quanto à aplicabilidade. Por exemplo, a determinação da densidade de unidades formadoras de colônia (UFC), tida como referência, é laboriosa e consome muito tempo e material, sendo muitas vezes imprecisa. Este método é bastante influenciado por erros na pesagem, pois o resultado está diretamente ligado à quantidade da amostra retirada (GOETTEL; INGLIS, 1997; JENKINS; GRZYWACZ, 2000; STENTELAIRE et al., 2001).

Outro método, também muito usado, é a contagem direta convencional (CD), que se baseia na contagem em um microscópio de luz, de esporos viáveis e não viáveis após incubação de uma suspensão de conídios, plaqueada em um meio nutritivo contendo ágar (semi-sólido), por tempo e temperatura pré-determinados (ALVES; PEREIRA, 1998; GOETTEL; INGLIS, 1997). No entanto, embora esta técnica seja mais aplicável, apresenta limitações, sendo importante aperfeiçoá-la para melhorar e facilitar as avaliações.

Milner; Huppatz e Swaris (1991) sugeriram a adição do fungicida seletivo Benlate® (Benomyl, Du Pont) ao meio de cultura em testes de viabilidade, para permitir uma germinação mais uniforme de *M. anisopliae* sem que a viabilidade fosse prejudicada. Devido às propriedades fungistáticas deste produto, os fungos podem permanecer incubados por muito mais tempo,

permitindo estudos comparativos de germinação entre diferentes isolados, inclusive de isolados que apresentam dormência, ou até mesmo avaliar uma mesma amostra em diferentes tempos de leitura. Devido a estas vantagens o Benlate passou a ser usado por vários autores em testes de viabilidade, por exemplo para fazer comparações entre isolados submetidos a diferentes condições ambientais ou mantidos por diferentes períodos de armazenamento. No entanto, este produto foi retirado do mercado não sendo mais comercializado atualmente.

Por isso, é necessária a seleção de um novo fungicida que apresente efeito semelhante quando misturado ao meio de cultura, para tornar mais precisas as avaliações da técnica de contagem direta. Os métodos de viabilidade atualmente disponíveis apresentam limitações para produtos formulados em óleo e quando estes se encontram misturados em água (suspensão de aplicação no campo). Alguns ajustes são necessários para que um mesmo teste de viabilidade possa ser usado para diferentes tipos de produtos. Poucos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de comparar a precisão dos métodos existentes e de propor melhorias para as técnicas de avaliação da viabilidade de produtos formulados.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples e econômico para a avaliação da viabilidade de conídios dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, e comparar com outros métodos que são normalmente utilizados, bem como validar o método proposto usando diferentes produtos microbianos comercializados no Brasil.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos no setor de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP. Os isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados no trabalho foram: ESALQ-PL63 de *B. bassiana* e ESALQ-1037 de *M. anisopliae*, todos (com exceção dos utilizados na validação com produtos) produzidos e fornecidos pela empresa Itaforte Bioprodutos® (Itapetininga, SP), nas formas de Conídios puros (EP) e Arroz+fungo (AF), e também nas formulações Pó molhável (WP) e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (SC), oriundos de um mesmo lote de produção, para cada fungo. Para todos os produtos a umidade dos conídios foi medida no período de pós-produção, com o auxílio de um medidor portátil Hygron DG (Gehaka), sendo padronizada em aproximadamente 7%. Conídios

puros, Arroz+fungo e Pó molhável foram armazenados a -20°C, e os formulados em óleo a 4°C, até o momento da utilização.

2.2.1 Método de avaliação da viabilidade

O método desenvolvido para determinação da viabilidade baseou-se nas recomendações sugeridas por Alves e Pereira (1998) e Goettel e Inglis (1997), com adaptações propostas para otimizar o tempo, material despendido para as análises e a precisão das avaliações.

Na etapa inicial de desenvolvimento foram testados diferentes tipos e tamanhos de placas, e diferentes formas de inoculação dos fungos. Foram testadas formas de uso da alça de Drigalski para o plaqueamento, disposição de gotas da suspensão dos fungos sobre o meio de cultura e o seu consequente espalhamento e concentração ideais das suspensões para cada tipo de formulação. Determinou-se também a quantidade adequada de meio utilizada em cada placa, a seleção de campos (visadas) para contagem, uso de lamínulas e corantes para facilitar a visualização e o tempo gasto para as avaliações nas diferentes condições testadas. Em cada um destes estudos as características das formulações foram levadas em consideração.

Os testes de viabilidade foram conduzidos em placa de petri tipo Rodac® ("Replicate Organism Detection and Counting", 60×10 mm) contendo 5 mL de meio de cultura, vertidos na face milimetrada (Fig. 1) da placa em superfície plana na câmara de fluxo. A suspensão fúngica (150 μL com concentração entre 0,7 e 1×10^6 conídios/mL) foi inoculada no centro da placa, com micropipeta de uma só vez, preenchendo os quatro quadrados centrais. Após a evaporação da água, as placas foram fechadas e incubadas para germinação em estufa B.O.D. (ver depois). A avaliação da viabilidade procedeu-se com a contagem direta dos conídios viáveis e inviáveis em microscópio óptico (Carl Zeiss AxioSkop 50®) no aumento de 400×, focando-se diretamente um campo no centro de cada quadrado, sem escolher ou alterar o local de visualização, totalizando quatro contagens e mais de 200 conídios em média por placa. Conídios que apresentavam o tubo germinativo com o comprimento igual ou maior do que o diâmetro foram considerados viáveis. Este método foi utilizado para todas as avaliações realizadas durante os estudos descritos abaixo, exceto para a formulação em óleo emulsionável pura (produto) e quando misturada com água para o preparo da suspensão de aplicação. Para os produtos a base de óleo, foi incluída uma etapa para

possibilitar a retirada do óleo, e consequentemente facilitar a avaliação, antes da amostra ser processada segundo o método descrito.

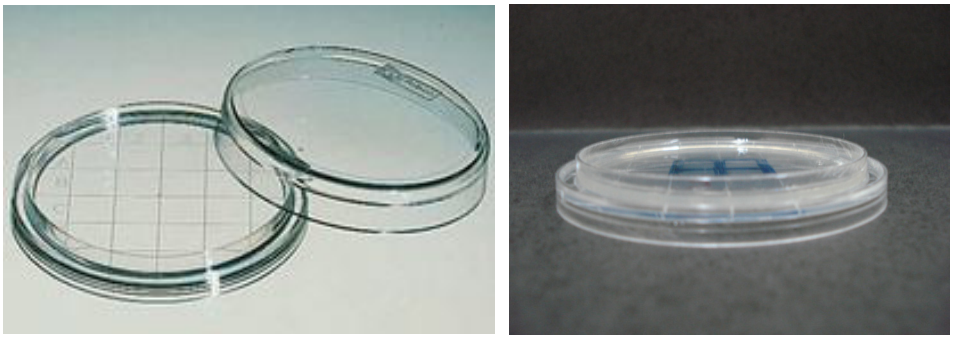

Figura 1 - Placas tipo Rodac® utilizadas para as avaliações de viabilidade

2.2.2 Método para produtos formulados a base de óleo emulsionável

Amostras de 1 mL de produto foram transferidas para tubos de microcentrífuga ("eppendorf") com capacidade de 1,5 mL, e centrifugadas por 5 min. à 2500rpm (573,1×g), (modificado de DAOUST; WARD; ROBERTS, 1983).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo os conídios no fundo foram deixados invertidos sobre papel de filtro por 15 min. para eliminação do restante de óleo. Decorrido este período, adicionaram-se 100 µL de emulsionante Solub'oil® (General Chemicals e Service Ltda) por tubo, misturando-se com o auxílio de ponteira de micropipeta. Os conídios foram ressuspendidos em 1 mL de solução estéril de Tween 80 (0,05%) agitando-se em vortex por 2 min.

Após este processo, 1 mL da suspensão foi transferida para tubos de fundo chato contendo 9 mL de solução estéril de Tween 80 (0,05%), procedendo-se as diluições seriadas para contagem em câmara de Neubauer (ALVES; MORAES, 1998), fazendo-se o plaqueamento e a avaliação como descrito anteriormente no item 2.2.1.

2.2.3 Método para suspensão de aplicação ("calda") preparada com formulações em óleo emulsionável

Para determinação da viabilidade da "calda" de aplicação de produtos a base de óleo emulsionável é necessário eliminar o máximo possível do óleo da suspensão antes do plaqueamento em meio de cultura. O óleo impede a deposição dos conídios no meio e dificulta a visualização durante as avaliações. Assim, amostras de 40 mL das suspensões contidas em tubos de centrífuga (Falcon) receberam 100 µL de Solub'oil® (deve-se utilizar 100 µL para cada 2,0 mL de óleo que forem utilizados no preparo da suspensão de aplicação), agitando-se bem por 1 min. em agitador vortex até ótima homogeneização. Centrifugou-se por 5 min. à 2500rpm (573,1×g) a 4ºC (Centrífuga Sorvall T-6000B), e após isto retirou-se da centrífuga com cuidado para não misturar as fases que apresentavam separação bem definida. Foi colocada a pipeta até o fundo do tubo, onde os conídios estavam, e coletado 1 mL passando posteriormente para tubos de fundo chato com 9 mL de solução estéril de Tween 80 (0,05%), procedendo-se as diluições seriadas para o plaqueamento e a avaliação como descrito no item 2.2.1.

2.2.4 Definição de parâmetros do método de avaliação da viabilidade

Com as etapas do método estabelecidas, realizaram-se testes para definir qual o meio de cultura a ser utilizado, e os possíveis efeitos de antibióticos presentes neste meio de cultura, avaliando-se também a adição de fungistáticos ao meio de cultura e o tempo ótimo de incubação para avaliação na presença destes.

2.2.4.1 Seleção do meio de cultura para as análises de viabilidade

Primeiramente, avaliou-se a influência do meio de cultura na germinação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de Conídios puros e Arroz+fungo, e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável.

Os meios testados foram: (i) BDA preparado em laboratório (ALVES et al., 1998, pg.666); (ii) BDA comercial (Difco®); (iii) Meio de Esporulação (ALVES et al., 1998, pg.665) e (iv) Meio Ágar-água (Ágar 2%). Os meios foram vertidos e os fungos inoculados como descrito no item

2.2.1, incubando-se em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h) por 18h até a avaliação. Foram preparadas 3 repetições por tratamento (meio), em cada preparação dos fungos (EP, AF, WP, SC), totalizando 48 placas por fungo, sendo os experimentos realizados em duplicata.

2.2.4.2 Influência de antibiótico na germinação dos conídios

Realizou-se um experimento no qual foi avaliado o efeito de antibióticos na germinação de conídios dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* nas formas de Conídios puros e Arroz+fungo, e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável. Foi utilizado o antibiótico Pentabiótico Veterinário Reforçado® (Fort Dodge Saúde Animal) o qual contém as substâncias benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base e estreptomicina base.

Os antibióticos foram adicionados após o preparo e autoclavagem do meio de cultura BDA. Os fungos foram inoculados como descrito no item 2.2.1, incubando-se em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h) por 18h. Num primeiro experimento, avaliou-se em todas as formulações o efeito da adição de 5 mg/L de meio, concentração recomendada para meios de isolamento de fungos (ALVES et al., 1998), comparado ao controle sem antibiótico. Foram preparadas 3 repetições por tratamento, em cada preparação dos fungos (EP, AF, WP, SC), totalizando 24 placas por fungo. Em outro experimento avaliou-se o efeito de diferentes concentrações, 0, 15, 40 e 75 mg/L de meio nos Conídios puros dos fungos. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento, perfazendo 12 placas por fungo. Ambos os experimentos foram realizados em duplicata.

2.2.4.3 Influência de fungistáticos na germinação dos conídios

O uso de fungistáticos para uniformizar a germinação foi avaliado para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* nas formas de Conídios puros e Arroz+fungo, e nas formulações Pó molhável e Suspensão Concentrada em óleo emulsionável. Estudos preliminares indicaram a viabilidade do uso do fungicida comercial Derosal® (Bayer CropScience AG) por um período de incubação de 28h, para ambos os isolados dos fungos. Posteriormente, foi realizado um ensaio comparando-se Derosal® com o fungicida Benlate® (princípio ativo Benomyl, DuPont). O objetivo deste estudo foi encontrar um produto alternativo para recomendação em testes de

viabilidade, visto que o produto que vinha sendo utilizado, Benomyl (MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991), não é mais comercializado.

Os produtos foram adicionados ao meio BDA na concentração recomendada (10 µL /L) após a autoclavagem. O meio foi vertido e os fungos inoculados como descrito no item 2.2.1, incubando-se em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h) por 28h até a avaliação, sendo a testemunha avaliada após 18h.

Os tratamentos consistiram de três meios de cultura e quatro formulações dos fungos sendo utilizadas 3 repetições por tratamento. Foram testados os meios: meio BDA (testemunha), meio BDA com 10 µL /L de Benlate®, meio BDA com 10 µL /L de Derosal® e as preparações dos fungos em EP, AF, WP e SC, totalizando 36 placas por fungo, sendo realizado em duplicata.

Posteriormente, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de Derosal® na viabilidade de conídios (EP) dos fungos. O produto foi adicionado ao meio de cultura BDA nas concentrações de 0, 10, 30 e 60 µL /L, e os meios foram vertidos e os fungos inoculados como descrito no item 2.2.1, incubando-se em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h) por 28h e a testemunha (sem Derosal) por 20h até a avaliação. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento, perfazendo 12 placas por fungo, sendo também realizado em duplicata.

2.2.4.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, analisando-se os dados obtidos quanto à variância pelo teste F, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$) exceto para os dados do primeiro experimento do item 2.2.4.2, que foram comparados pelo teste t-Student ($P<0,05$), utilizando-se em todos os casos o programa estatístico SAS (SAS, 2003).

2.2.5 Validação do método de avaliação da viabilidade

Após a definição do meio de cultura, do antibiótico, da concentração do fungistático e do tempo de incubação para avaliação, foi realizada a validação do método desenvolvido comparando-se com outras formas de avaliação da viabilidade de fungos entomopatogênicos encontradas na literatura.

2.2.5.1 Comparação de dois métodos de avaliação direta de viabilidade

Para validar o método desenvolvido no presente trabalho (Novo) e compará-lo com o método proposto por Alves e Pereira (1998) (Padrão), o qual é amplamente utilizado para análises de fungos entomopatogênicos comerciais e avaliações experimentais, utilizaram-se produtos à base de *B. bassiana* (7 produtos) e *M. anisopliae* (9 produtos), havendo produtos nas formas de Conídios puros e Arroz+fungo, e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável, de maneira que todas as adaptações do método fossem testadas.

Os produtos testados foram adquiridos junto às empresas Ballagro©, Biocontrol©, Biotech©, Itaforte Bioprodutos©, Natural Rural© e ao Centro de Tecnologia Canavieira - SP, tratando-se de diferentes isolados e oriundos de processos de produção distintos. A cada um dos produtos recebidos foi atribuída uma letra para a empresa e para o tipo de formulação de forma a ocultar a identidade dos produtos. Estes foram então armazenados sob refrigeração em freezer (-20°C) para Conídios puros, Arroz+fungo e Pó molhável, e em geladeira (4°C) no caso da Suspensão concentrada em óleo emulsionável, por no máximo 10 dias até a avaliação.

Três amostras independentes (1g de EP, 10g de AF e 5g de WP cada) foram retiradas de cada produto e suspendidas em solução estéril de Tween 80 (0,05%), misturando-se por 10 min., e procedendo-se as diluições seriadas em tubos de fundo chato para contagem em câmara de Neubauer (ALVES; MORAES, 1998). Nos produtos em Suspensão concentrada em óleo emulsionável, as diluições foram feitas como descrito no item 2.2.2 para o método Novo, e para o método Padrão, os produtos não foram diluídos para o plaqueamento, aplicando-se 3 µL sobre a superfície do meio de cultura e espalhando bem com alça de Drigalski. Foram utilizadas 5 repetições para cada amostra nas combinações de método e formas dos fungos testados (15 repetições por método). As placas de ambos os métodos foram incubados em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h). Para o método Novo a avaliação foi feita após 28h como em 2.2.1, e no caso do método Padrão após 18h como recomendado por Alves e Moraes (1998).

2.2.5.2 Comparação dos métodos de viabilidade direta e Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

As avaliações foram realizadas com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de Conídios puros e Arroz+fungo, e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável. Três amostras independentes foram retiradas dos produtos, diluídas e quantificadas como descrito anteriormente, fazendo-se o plaqueamento como em 2.2.1 para o método de viabilidade direta Novo. O método de UFC foi realizado segundo Alves e Moraes (1998), com meio de cultura BDA e placas de petri médias (90×15 mm). Foram preparadas 5 repetições por amostra, sendo 15 placas por método, em cada preparação dos fungos, totalizando 120 placas por fungo.

As placas foram incubadas a 26 ± 2ºC e fotofase de 14h. As placas referentes ao método de viabilidade foram avaliadas após 28h. Aquelas referentes ao método UFC foram avaliadas após 3 dias, contando e marcando as colônias no fundo das placas e incubando-as novamente para confirmação após 7 dias de incubação.

2.2.5.3 Comparação dos métodos de viabilidade direta e viabilidade por Fluorescência

Os métodos de viabilidade direta (Novo) e por fluorescência foram comparados utilizando-se os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de Conídios puros e Arroz+fungo, e também nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável. Três amostras independentes de cada produto foram retiradas (1g de EP, 10g de AF e 5g de WP cada), diluídas e previamente quantificadas, fazendo-se o plaqueamento e a incubação como descrito em 2.2.1 para o método de viabilidade direta Novo, sendo preparadas 5 placas por amostra, totalizando-se 15 repetições para cada forma/formulação dos fungos.

Para o método de fluorescência, a solução estoque do fluorocromo diacetato de fluoresceína (DAF) (Sigma Chemical Co.) foi preparada adicionando-se 4 mg por mL de acetona, e na solução estoque de iodeto de propídio (IP) (Sigma Chemical Co.) utilizou-se 3 mg do reagente para cada mL de água deionizada. As soluções foram armazenadas a 4°C em frascos de vidro com tampa recobertas com papel alumínio para limitar a exposição à luz (JONES; SNEFT, 1985). A solução de trabalho de DAF e IP foi preparada imediatamente antes do ensaio,

utilizando-se 90 µL de solução estoque de DAF e 60 µL de IP diluídos em 5 mL de água deionizada, mantendo-a em gelo durante a utilização (adaptado de FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990). Esta solução foi usada por aproximadamente 1h, e quando decorrido este tempo, foi descartada e substituída por uma nova solução de trabalho.

Usando-se as mesmas suspensões de conídios utilizadas no método Novo e a solução de trabalho descrita anteriormente, as lâminas foram preparadas ao abrigo de luz em um quarto escuro, fazendo-se 5 lâminas por amostra, totalizando-se 15 repetições para cada forma/formulação dos fungos. Em cada lâmina foi colocado 1 µL da suspensão fúngica e uma quantidade igual da solução de trabalho, misturando-se com o auxílio da ponteira e recobrindo-a com a lamínula.

As avaliações pelo método Novo foram realizadas como descrito anteriormente. Para as avaliações com o método de fluorescência foram contados no mínimo 100 conídios em cada lâmina, em diferentes visadas, visualizando-os sob o aumento de 1000× em um microscópio Carl Zeiss modelo AxioSkop 50®, equipado com acessório de epifluorescência contendo uma lâmpada de mercúrio (100 W), um filtro excitador (450 - 490 nm; blue light) e um filtro de barreira de 520 nm em conjunto com um espelho dicrômico (FT-510).

2.2.5.4 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, sendo os dados analisados descritivamente (Média, erro padrão da média, desvio padrão, variância do ensaio, coeficiente de variação do ensaio, etc.). No experimento do item 2.2.5.2 avaliou-se também a quantificação de conídios viáveis utilizando-se os dois métodos, e os dados de UFC foram convertidos de UFC para conídios viáveis/g ou conídios viáveis/mL de fungo, para possibilitar a comparação entre as duas técnicas de avaliação. Também foi feita a análise de correlação (segundo índice de Pearson, $P<0,05$) entre os valores obtidos em cada método e os valores da quantificação prévia realizada com hemacitômetro. As análises descritivas e de correlação foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS, 2003).

2.3 Resultados

2.3.1 Seleção do meio de cultura para as análises de viabilidade

A germinação de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes produtos não diferiu significativamente nos meios BDA, BDA comercial e ME. Apenas o meio Ágar-água apresentou efeito negativo sobre a germinação do fungo *B. bassiana* na forma de EP ($F_{3,20}$ = 72,9; P<0,0001) e na formulação WP ($F_{3,20}$ = 22,9; P<0,0001), sendo que não foi verificado o mesmo para AF e SC (Tabela 1). A germinação dos conídios na forma de EP e de WP no meio Ágar-Água foi aproximadamente 10% menor do que nos meios ME e BDA, respectivamente. A germinação de conídios de *B. bassiana* variou de 84,0 ± 0,7% a 94,1 ± 0,8% em EP e de 94,1 ± 0,8% a 94,1 ± 0,8% em SC.A germinação de *M. anisopliae* variou de 54,4 ± 0,8 a 63,1 ± 1,7 % para conídios na forma de WP e de 89,9 ±0,1 a 92,9 ± 0,3% para SC. Os meios de cultura não afetaram a germinação de conídios de *M. anisopliae* provenientes de formulações (P<0,05).

Tabela 1 - Viabilidade (%) de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na forma de Conídios puros (EP), Arroz+fungo (AF), Pó molhável (WP) e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (SC) em diferentes meios de cultura (26 ± 2ºC, fotofase de 14h)

Fungo	**Tipo**	**Meios de Cultura[1]**				**C.V. (%)**
		BDA	BDA com	ME	AA	
Beauveria bassiana	EP	93,4 ± 1,2 a	92,4 ± 0,5 a	94,1 ± 0,8 a	84,0 ± 0,7 b	1,7
	AF	88,7 ± 0,7 a	85,9 ± 1,2 a	89,9 ± 1,8 a	88,1 ± 3,1 a	3,8
	WP	89,1 ± 0,8 a	88,8 ± 0,9 a	87,1 ± 0,9 a	81,6 ± 1,7 b	2,1
	SC	76,8 ± 1,0 a	78,8 ± 2,3 a	82,4 ± 0,5 a	78,7 ± 3,0 a	4,4
Metarhizium anisopliae	EP	89,6 ± 2,0 a	89,0 ± 0,2 a	92,7 ± 1,3 a	90,8 ± 1,6 a	2,8
	AF	81,2 ± 1,3 a	78,0 ± 0,5 a	83,4 ± 1,2 a	79,8 ± 1,6 a	2,5
	WP	54,4 ± 0,8 a	57,6 ± 5,1 a	63,1 ± 1,7 a	59,8 ± 1,7 a	8,4
	SC	91,3 ± 0,3 a	92,9 ± 0,3 a	89,9 ±0,1 a	92,6 ± 1,3 a	1,3

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05). [1] BDA (Batata-dextrose-ágar); BDAcom (BDA comercial Difco®); Meio de esporulação (Alves *et al.* 1998); AA (Ágar-água 2%)

2.3.2 Influência do antibiótico na germinação dos conídios

A adição do antibiótico Pentabiótico ao meio de cultura BDA na concentração recomendada (5 mg/L de meio) não influiu na germinação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (P<0,05) em nenhum dos produtos/formulações testados (EP, AF, WP e SC) (Tabela 2). Exceto para *M. anisopliae* na formulação em Pó molhável, cuja germinação apresentou valores abaixo de 55%, para todas as outras combinações de fungos e formulações a viabilidade foi superior a 80%.

Tabela 2 - Viabilidade (%) de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar com (+) e sem (-) a adição de Pentabiótico1 na concentração de 5 mg/L de meio de cultura (26 ± 2ºC e fotofase de 14h)

Antibiótico	**Produto/Formulação[2]**			
	EP	**AF**	**WP**	**SC**
	Beauveria bassiana			
+	89,2 ± 1,0 a	91,1 ± 0,9 a	82,5 ± 1,8 a	84,5 ± 1,8 a
-	87,4 ± 1,0 a	92,7 ± 2,4 a	80,6 ± 0,7 a	83,4 ± 1,5 a
C.V. (%)	1,95	3,41	2,95	3,37
	Metarhizium anisopliae			
+	91,5 ± 1,0 a	83,4 ± 0,6 a	54,9 ± 1,5 a	86,1 ± 0,5 a
-	92,8 ± 1,1 a	86,3 ± 1,7 a	52,7 ± 0,3 a	85,1 ± 1,0 a
C.V. (%)	2,05	2,51	3,46	1,59

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra na coluna, para cada fungo, não diferem entre si, segundo o teste t-Student (P<0,05). [1]Produto contém benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base e estreptomicina base. [2]Na forma de Conídios puros (EP), Arroz+fungo (AF), e nas formulações Pó molhável (WP) e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (SC).

O Pentabiótico mesmo em concentrações até 15 vezes maiores do que a recomendada, não afetou a germinação de Conídios puros (não formulados) de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Tabela

3). A germinação foi superior a 85% para ambos os fungos testados em todas as concentrações do antibiótico.

A adição do antibiótico Pentabiótico ao meio de cultura em testes de viabilidade foi efetiva no controle de contaminações bacterianas sem apresentar qualquer efeito sobre os fungos entomopatogênicos testados.

Tabela 3 - Viabilidade (%) de conídios (não formulados) de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Pentabiótico[1] (26 ± 2ºC e fotofase de 14h)

Pentabiótico (mg/L de meio)	**Fungos**	
	B. bassiana	***M. anisopliae***
0	93,6 ± 1,5 a	88,0 ± 0,7 a
15	91,9 ± 0,9 a	86,0 ± 1,9 a
45	90,9 ± 1,1 a	87,2 ± 1,1 a
75	88,9 ± 0,4 a	89,2 ± 1,2 a
C.V. (%)	1,98	2,56

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05). [1]Produto contém benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base e estreptomicina base.

2.3.3 Influência de fungistáticos na germinação dos conídios

A germinação dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* provenientes dos diferentes produtos/formulações na presença do fungicida Benlate® não diferiu estatisticamente da germinação em Derosal® (Tabela 4). Algumas diferenças foram observadas nos tratamentos com fungicidas em relação ao controle sem fungicida. Maior germinação de *B. bassiana* em WP e SC foi observada nos tratamentos que continham os produtos fungistáticos do que no controle ($F_{2,15}$ = 9,2; P=0,0147; $F_{2,15}$ = 14,6; P=0,0049). No caso de AF também ocorreu diferença entre os tratamentos ($F_{2,15}$ = 8,4; P=0,0181), sendo a maior porcentagem de germinação encontrada no tratamento que continha o produto Benlate® adicionado ao meio de cultura.

Para *Metarhizium anisopliae*, não ocorreu diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos em nenhuma das formas do fungo avaliadas.

Tabela 4 - Viabilidade (%) de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar com e sem a adição dos fungicidas Benlate® e Derosal® na concentração de 10 µL /L de meio (26 ± 2ºC e fotofase de 14h)

Meio de Cultura	**Produto/Formulação[1]**			
	EP	**AF**	**WP**	**SC**
		Beauveria bassiana		
BDA	94,1 ± 1,0 a	84,9 ± 1,1 b	85,6 ± 0,3 b	76,2 ± 1,5 b
BDA+Benlate®	92,7 ± 0,7 a	90,4 ± 0,8 a	89,6 ± 0,3 a	82,1 ± 1,6 a
BDA+Derosal®	94,9 ± 0,4 a	86,7 ± 1,0 ab	89,9 ± 1,9 a	85,9 ± 0,3 a
C.V. (%)	1,3	1,9	2,3	2,7
		Metarhizium anisopliae		
BDA	91,0 ± 0,8 a	81,7 ± 0,2 a	54,0 ± 1,9 a	91,3 ± 0,3 a
BDA+Benlate®	89,5 ± 0,7 a	79,8 ± 2,0 a	49,7 ± 1,7 a	93,6 ± 0,9 a
BDA+Derosal®	89,0 ± 0,1 a	80,9 ± 1,6 a	52,2 ± 1,7 a	91,6 ± 1,1 a
C.V. (%)	1,18	3,19	5,85	1,55

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra na coluna, em cada fungo, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05). [1]Produtos a base de Conídios puros (EP), Arroz+fungo (AF), e nas formulações Pó molhável (WP) e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (SC).

Os testes com diferentes concentrações do fungicida Derosal®, revelaram que nas concentrações de 30 µL /L e 60 µL /L a germinação dos conídios de *B. bassiana* foi reduzida em aproximadamente 6% e 8%, respectivamente em relação à testemunha ($F_{3,20}$ = 8,6; P=0,0026) (Tabela 5). No caso de *M. anisopliae*, embora tenham sido observadas diferenças entre os tratamentos ($F_{3,20}$ = 3,7; P=0,0438), e uma tendência de redução na germinação dos conídios em

função do aumento da concentração de Derosal®, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre estes tratamentos e o controle.

Tabela 5 - Viabilidade (%) de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura BDA com diferentes concentrações do fungicida Derosal®(26 ± 2ºC e fotofase de 14h)

Derosal® (µL /L de meio)	**Fungos**	
	B. bassiana	***M. anisopliae***
0	92,2 ± 1,5 a	90,4 ± 2,1 ab
10	91,8 ± 0,5 a	90,9 ± 1,7 a
30	86,1 ± 1,9 b	88,6 ± 1,1 ab
60	84,5 ± 1,0 b	84,5 ± 0,9 b
$F_{3,20;\ 0,05}$	8,59	3,67
C.V. (%)	3,02	3,43

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05).

Desta forma, para análises de viabilidade recomenda-se a adição do fungicida Derosal® ao meio de cultura na concentração de 10 µL /L de meio.

2.3.4 Comparação de dois métodos de avaliação direta de viabilidade

Comparando-se o método direto desenvolvido no presente trabalho (Novo), com a técnica de viabilidade direta proposta em Alves e Pereira (1998) (Padrão), verificaram-se em todos os produtos avaliados, tanto para *B. bassiana* quanto para *M. anisopliae*, menor variação nos resultados quando se utilizou o método Novo, representado pelos valores inferiores do coeficiente de variação (CV) dos ensaios (Tabelas 6 e 7).

Nos produtos a base de *B. bassiana*, a menor diferença encontrada foi para o fungo na forma de Conídios puros, com CV de 3,1% no método padrão e 2,8% no Novo, podendo se considerar neste caso pouca variação dentro e entre os métodos.

Por outro lado, o coeficiente de variação das análises do produto da empresa D (Arroz+fungo) pelo método Padrão (17,6%) é quase três vezes maior que o encontrado no Novo (6,7%) (Tabela 6), revelando a grande variação existente entre as repetições quando se utiliza este método. As porcentagens de germinação determinadas pelo método Novo foram constantes entre as repetições com CV menor do que 7%, exceto para o produto da empresa F (pó-molhável) que teve um CV de 17,9%, mas ainda bem menor do que pelo método padrão (29,3%).

Para *M. anisopliae*, também foi possível verificar que a variabilidade dos resultados pelo método Novo é igual ou inferior à variabilidade dos dados do método padrão (Tabela 7). Menores diferenças entre os métodos foram observadas quando o fungo encontrava-se na forma de Conídios puros, com CV de 3,25% e 3,21 % para os métodos Padrão e Novo para o produto da empresa B e 1,4% e 1,1% para os da empresa E, respectivamente. A maior variação foi observada no produto da empresa A (Arroz+Fungo), no qual o CV do método Padrão (21,5%) foi quase sete vezes maior que no Novo (3,2%).

De maneira geral, para ambos os fungos, os produtos que apresentaram maiores variações nas porcentagens de germinação entre as repetições, independente da técnica utilizada, foram os que se encontravam na formulação pó-molhável, sendo os valores mais altos observados na análise do produto de *M. anisopliae* da empresa C, com CV de 65,6% no método Padrão e 65,1% no Novo. A viabilidade dos conídios neste produto foi extremamente baixa (<1,3%).

Tabela 6 - Comparação entre dois métodos diretos de avaliação da viabilidade do fungo *Beauveria bassiana* proveniente de diferentes produtos comerciais, na forma de Conídios puros, Arroz+fungo, Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (26 ± 2ºC, fotofase de 14h)

Origem dos Produtos	**Tipo do Produto/ Formulação**	**Método**	**% de Germinação**	**C.V.**
Empresa B	Conídios Puros	Padrão	85,9 ± 0,85	3,1%
		Novo	89,6 ± 0,81	2,8%
Empresa B	Arroz+Fungo	Padrão	87,2 ± 1,87	6,7%
		Novo	86,9 ± 0,87	3,2%
Empresa B	Pó molhável	Padrão	71,6 ± 1,09	4,9%
		Novo	80,9 ± 0,82	3,2%
Empresa B	Suspensão concentrada em óleo	Padrão	85,6 ± 0,96	4,3%
		Novo	91,9 ± 0,58	2,4%
Empresa C	Pó molhável	Padrão	43,2 ± 1,70	12,5%
		Novo	44,8 ± 0,76	5,4%
Empresa D	Arroz+Fungo	Padrão	33,5 ± 1,52	17,6%
		Novo	25,1 ± 0,43	6,7%
Empresa F	Pó molhável	Padrão	32,4 ± 2,45	29,3%
		Novo	15,3 ± 0,86	17,9%

Médias (±EPM) referentes às porcentagens de germinação obtidas nos dois métodos testados. C.V. = Coeficiente de variação do ensaio.

Tabela 7 - Comparação entre dois métodos diretos de avaliação da viabilidade do fungo *Metarhizium anisopliae* proveniente de diferentes produtos comerciais, na forma de Conídios puros, Arroz+fungo, Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (26 ± 2ºC, fotofase de 14h)

Origem dos Produtos	Tipo do Produto/ Formulação	Método	% de Germinação	C.V.
Empresa A	Arroz+Fungo	Padrão	61,5 ± 3,4	21,5%
		Novo	68,9 ± 0,6	3,2%
Empresa B	Conídios Puros	Padrão	82,5 ± 0,8	3,25%
		Novo	79,4 ± 0,8	3,21%
Empresa B	Arroz+Fungo	Padrão	84,9 ± 1,6	5,8%
		Novo	89,9 ± 0,7	2,6%
Empresa B	Pó molhável	Padrão	52,8 ± 1,0	6,1%
		Novo	47,9 ± 0,7	5,3%
Empresa B	Suspensão concentrada em óleo	Padrão	58,5 ± 0,8	3,6%
		Novo	91,2 ± 0,7	3,0%
Empresa C	Pó molhável	Padrão	1,29 ± 0,2	65,6%
		Novo	0,96 ± 0,2	65,1%
Empresa D	Arroz+Fungo	Padrão	62,9 ± 0,67	4,2%
		Novo	66,6 ± 0,6	3,2%
Empresa E	Conídios Puros	Padrão	94,4 ± 0,4	1,4%
		Novo	94,9 ± 0,3	1,1%
Empresa E	Arroz+Fungo	Padrão	90,5 ± 0,7	2,3%
		Novo	92,1 ± 0,5	1,6%

Médias (±EPM) referentes às porcentagens de germinação obtidas nos dois métodos testados. C.V. = Coeficiente de variação do ensaio.

2.3.5 Comparação dos métodos de viabilidade direta e Unidades Formadoras de Colônia

Verificaram-se para todas as preparações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* grandes discrepâncias entre os dados obtidos nas avaliações com o método de viabilidade direta (Novo) e com a técnica indireta baseada em unidades formadoras de colônias (UFC). Em todos os casos, o método Novo demonstrou-se mais preciso, com menor variação entre as repetições nos experimentos, visto que apresentou valores menores do coeficiente de variação dos ensaios (Tabela 8). No método Novo o CV não ultrapassou os 6% em nenhuma das formas dos fungos testadas, já no método indireto estes valores foram bastante altos, sendo os maiores valores encontrados no produto na forma de Conídios puros para *B. bassiana* (79,1%) e em Suspensão concentrada em óleo emulsionável de *M. anisopliae* (86,3%).

Para ambos os fungos, as maiores diferenças entre os métodos foram observadas nos produtos de Suspensão concentrada em óleo emulsionável, sendo o CV do método de UFC 32 vezes maior que o encontrado no Novo para *B. bassiana*, e 28 vezes maior em *M. anisopliae*.

Quando os valores de germinação obtidos nos dois métodos foram convertidos em conídios viáveis/g ou /mL (Tabela 8), em relação à quantificação realizada previamente em câmara de Neubauer (Hemacitômetro), o método UFC revelou resultados inconsistentes. Na maioria dos casos, este método subestimou a concentração de conídios, e em outros casos apresentou valores maiores que os encontrados na quantificação total, como foi observado para os produtos em Conídios puros e Arroz+fungo de *M. anisopliae* (Tabela 8). Nestas formas do fungo, comparando-se os valores obtidos na contagem de colônias com a contagem total realizada inicialmente, o método UFC apresentou concentração superior à realizada em hemacitômetro.

Os produtos formulados em óleo emulsionável (SC) de ambos os fungos foram os que tiveram a viabilidade mais subestimada, com valores 54% menores para *B. bassiana*, e 73% menores para *M. anisopliae*. Na formulação Pó molhável estes valores foram 18% menores para *B. bassiana*, e 10% menores para *M. anisopliae*, e os Conídios puros de *B. bassiana* foram subestimados em 50%.

Fazendo-se uma correlação entre os resultados obtidos em cada método e a quantificação total (por Hemacitômetro), o método Novo apresentou correlação altamente significativa de 0,987 ($P<0.0001$), segundo índice de Pearson, enquanto o método de UFC apresentou correlação de 0,720 ($P=0.044$).

Tabela 8 - Comparação dos métodos da viabilidade direta (Novo) e Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para determinação da viabilidade dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* proveniente de produtos/formulações comerciais (26 ± 2ºC, fotofase de 14h)

Fungo	Produto	Quantificação Total [1]	Método	N° de conídios viáveis	% de Germinação	C.V.
Beauveria bassiana	**EP**	$9,1\times10^{10}$/g	Novo	8,2 (±0,12) $\times10^{10}$/g	90,7 ± 3,2	3,2%
			UFC	3,8 (±1,3) $\times10^{10}$/g	41 ± 11,3	79,7%
Beauveria bassiana	**AF**	4×10^{9}/g	Novo	3,2 (±0,06) $\times10^{9}$/g	81,3 ± 1,1	4,3%
			UFC	3,3 (±2,8) $\times10^{9}$/g	83 ± 7,9	26,3%
Beauveria bassiana	**WP**	$4,1\times10^{9}$/g	Novo	3,2 (±0,08) $\times10^{9}$/g	78,5 ± 1,1	5,6%
			UFC	2,5 (±1,9) $\times10^{9}$/g	61 ± 11,3	36,8%
Beauveria bassiana	**SC**	$1,8\times10^{9}$/mL	Novo	1,6 (±0,02) $\times10^{9}$/mL	91,9 ± 0,6	2,4%
			UFC	6,9 (±1,7) $\times10^{8}$/mL	38 ± 12,3	77,1%
Metarhizium anisopliae	**EP**	$5,4\times10^{10}$/g	Novo	4,9 (±0,06) $\times10^{10}$/g	90,9 ± 0,7	3,1%
			UFC	5,9 (±1,1) $\times10^{10}$/g	109 ± 13,3	50,7%
Metarhizium anisopliae	**AF**	$2,6\times10^{9}$/g	Novo	2,1 (±0,03) $\times10^{9}$/g	79,5 ± 0,8	3,1%
			UFC	2,62 (±2,3) $\times10^{9}$/g	101 ± 20,7	28%
Metarhizium anisopliae	**WP**	$1,1\times10^{9}$/g	Novo	1,0 (±0,01) $\times10^{9}$/g	47,9 ± 0,7	5,3%
			UFC	1,9 (±2,2) $\times10^{8}$/g	38 ± 8,3	48,9%
Metarhizium anisopliae	**SC**	$2,6\times10^{9}$/mL	Novo	1,25 (±0,03) $\times10^{9}$/mL	91,2 ± 0,7	3,0%
			UFC	1,0 (±0,6) $\times10^{9}$/mL	18 ± 20,7	86,3%

Médias (±EPM) apresentadas; C.V. = Coeficiente de variação do ensaio. [1] Cálculo referente à concentração inicial obtida em Hemacitômetro; Produtos a base de Conídios puros (EP), Arroz+fungo (AF), Pó molhável (WP) e Suspensão concentrada em óleo emulsionável (SC).

2.3.6 Comparação dos métodos de viabilidade direta e viabilidade por Fluorescência

Nos produtos a base de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em óleo emulsionável não foi possível realizar as avaliações pela técnica de fluorescência, devido ao problema da solução dos corantes que não se mistura adequadamente a estes produtos, ocasionando desuniformidade na coloração. Isto impossibilitou a avaliação por esta técnica. Nas demais formas dos fungos testadas a avaliação foi realizada satisfatoriamente, porém para Arroz+fungo e na formulação Pó molhável, além dos conídios, foi verificado a ocorrência de outras estruturas coradas que dificultaram a visualização e a contagem (Figura 2).

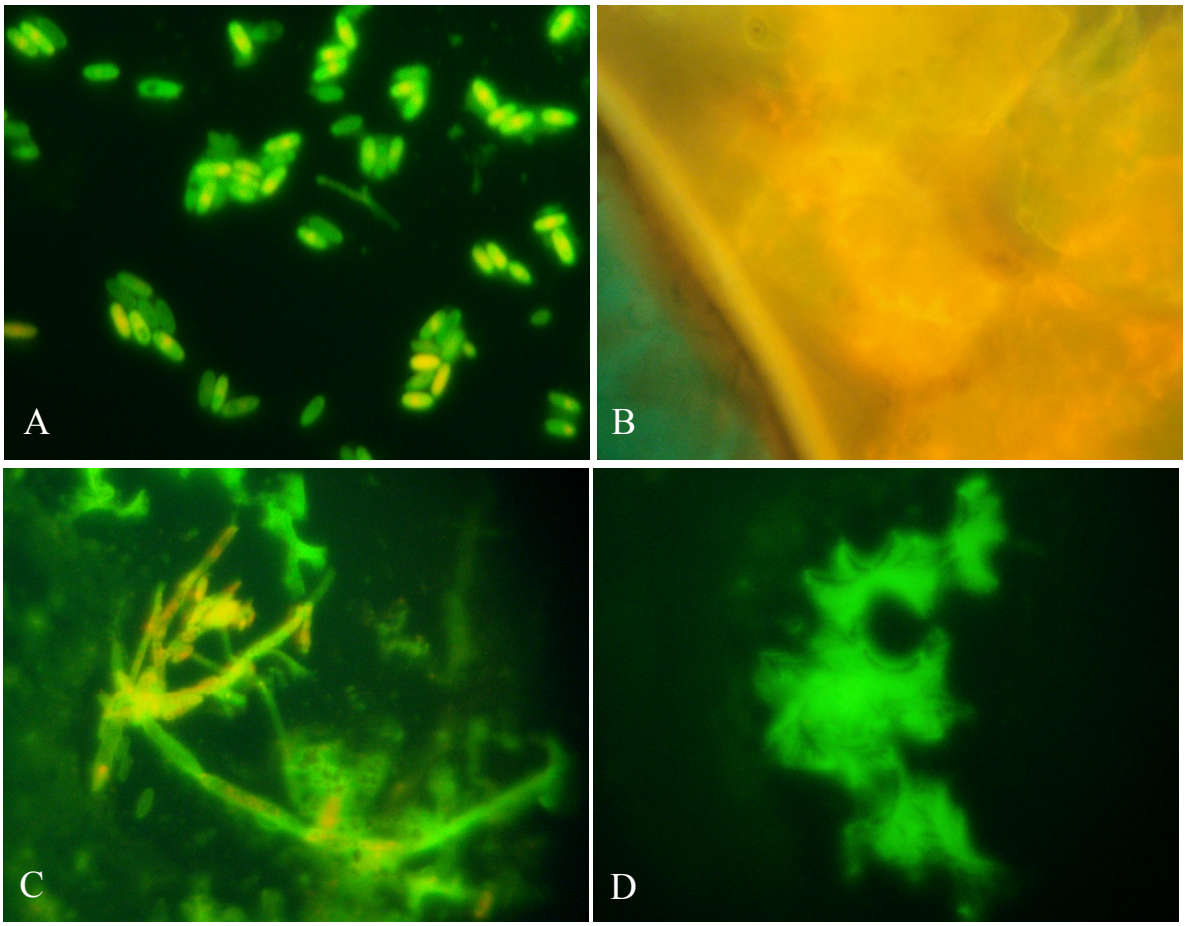

Figura 2 – Estruturas coradas com os fluorocromos diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio visualizadas no aumento de 1000×: Situação ideal de avaliação em Conídios puros de *M. anisopliae* (A); partícula de arroz da formulação Pó molhável de *B. bassiana* (B); estruturas hifais de *M. anisopliae* (C) e *B. bassiana* (D) ambos em Arroz+fungo

Esta maior dificuldade na avaliação não acarretou em aumentos significativos na variabilidade dos dados, pois a técnica de fluorescência não apresentou em nenhuma das formas avaliadas valores acima de 6% de CV dos ensaios (Tabela 9). Para os fungos na forma de Conídios puros e na formulação Pó molhável o método de viabilidade Novo foi ligeiramente mais preciso, apresentando valores inferiores do CV. No caso de Arroz+fungo para *B. bassiana* os valores do CV foram iguais em ambas as técnicas, e para *M. anisopliae* o método de fluorescência variou menos com CV de 3,6% contra 4,6% do método Novo.

Tabela 9 - Comparação dos métodos de avaliação da viabilidade direta (Novo) e viabilidade pela técnica de Fluorescência dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (26 ± 2ºC, fotofase de 14h)

Fungo	**Produto**	**Método**	**% de Germinação**	**C. V.**
Beauveria bassiana	Conídios Puros	Novo	93,8 ± 0,6	2,1%
		Fluorescência	88,5 ± 0,8	3,1%
Beauveria bassiana	Arroz+Fungo	Novo	87,4 ± 0,9	3,5%
		Fluorescência	83,6 ± 0,9	3,5%
Beauveria bassiana	Pó Molhável	Novo	77,7 ± 0,9	3,9%
		Fluorescência	73,8 ± 1,0	4,3%
Metarhizium anisopliae	Conídios Puros	Novo	92,8 ± 0,8	2,9%
		Fluorescência	85,8 ± 1,1	4,2%
Metarhizium anisopliae	Arroz+Fungo	Novo	78,0 ± 1,1	4,6%
		Fluorescência	78,7 ± 0,9	3,6%
Metarhizium anisopliae	Pó Molhável	Novo	67,9 ± 1,0	4,6%
		Fluorescência	74,4 ± 1,3	5,7%

Médias (±EPM) referentes às porcentagens de germinação obtidas nos dois métodos testados. C. V. = Coeficiente de variação do ensaio.

2.4 Discussão

O método proposto para determinação da viabilidade de fungos consiste no plaqueamento de conídios em meio de cultura BDA (preparado em laboratório), acrescido de antibiótico a 5 mg/L e com o fungicida Derosal® na concentração de 10 µL /L de meio. Outros meios de cultura podem ser usados (exceto Ágar-Água), entretanto, o meio BDA caracteriza-se por ser um meio simples, barato e de uso amplamente difundido, além de se mostrar bastante translúcido depois de vertido nas placas facilitando a visualização dos conídios. Trabalhos realizados por Francisco et al. (2006) demonstraram que o BDA foi um dos meios mais adequados para promover a germinação de conídios de fungos entomopatogênicos. A dextrose, amido solúvel e proteínas disponíveis neste meio possibilitam que mesmo os conídios de alguns isolados que não possuem grandes reservas nutricionais endógenas, germinem obtendo os nutrientes necessários a partir do meio de cultura. Ou seja, meios de cultura mais ricos em nutrientes oferecem melhores condições para germinação dos fungos (ISKANDAROV; GUZALOVA; DAVRANOV, 2006). Já meios pobres nutricionalmente, como o meio AA, influenciam negativamente a viabilidade dos fungos (IBRAHIM; BUTT; JENKINSON, 2002; LANE; TRINCI; GILLESPIE, 1991).

Menor germinação de conídios do fungo *B. bassiana* no meio AA após 15h de incubação foram observadas por Francisco et al. (2006), corroborando os resultados obtidos aqui para Conídios puros e também na formulação Pó molhável. No entanto, o que pode ter ocorrido foi apenas um atraso na germinação dos fungos no meio AA. Para isolados de outros fungos entomopatogênicos foi demonstrado que estes não sofrem influência na viabilidade quando cultivados em meios pobres de nutrientes (FRANCISCO et al., 2006), e segundo James (2001) esta é uma característica diretamente ligada à variação genética existente entre isolados. Como em análises de viabilidade busca-se conseguir a maior germinação de conídios uniformemente no menor tempo possível, o meio AA não deveria ser recomendado neste tipo de análise..

A adição de 5 mg/L Pentabiótico no de meio de cultura indicada por Alves et al. (1998) para outros antibióticos, foi suficiente para inibir o crescimento de contaminações em todos os testes realizados, sem influir na viabilidade dos conídios. A recomendação da adição de antibióticos no meio de cultura para inibir o crescimento de contaminantes nas avaliações de viabilidade é importante principalmente na formulação Pó molhável encontrada no Brasil, por conter muitos resíduos junto ao arroz moído, apresentando com freqüência contaminações nas

placas. Outros antibióticos poderiam provavelmente ser utilizados visto que os compostos normalmente utilizados como anticontaminantes bacterianos em meios de cultura como Penicilina, Tetraciclina, Estreptomicina, Eritromicina, Clorafenicol, apresentam ação bastante específica, ligando-se às subunidades dos ribossomos bacterianos e atuando diretamente na inibição da tradução (BLACK, 2002). Por isso, dificilmente podem apresentar alguma influência no processo de germinação dos fungos entomopatogênicos, que são organismos eucarióticos.

O fungicida Benlate® (benomyl) tem sido utilizado acrescido ao meio de cultura para uniformizar a germinação de conídios dos fungos *B. bassiana* (INGLIS; JOHNSON; GOETTEL, 1996) e *M. anisopliae* (MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991). Seu modo de ação nos fungos é por meio da inibição de uma das fases do processo de mitose, fazendo com que ocorra normalmente a formação do tubo germinativo, impedindo porém um maior desenvolvimento das hifas, e consequentemente o crescimento excessivo dos fungos (GOETTEL; INGLIS, 1997). No entanto, este produto não é mais comercializado atualmente, o que torna difícil conseguir o princípio ativo para utilização nas análises de laboratório. Demonstramos neste estudo que o fungicida Derosal® (também do grupo químico Benzimidazol) na concentração de 10 µL /L, pode ser utilizado em substituição ao Benlate, pois apresentou as mesmas propriedades fungistáticas. Este produto pode ser encontrado facilmente no mercado e apresenta benefícios nas análises de viabilidade de fungos (FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009; MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991), possibilitando a incubação por mais tempo sem gerar dificuldades nas avaliações, tornando possível uma série de estudos comparativos entre diferentes isolados ou dos mesmos isolados ao longo do tempo.

Nos testes de viabilidade de *B. bassiana* nas formulações em Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável foi observado que na presença dos fungicidas a viabilidade foi maior do que na testemunha sem fungicida. Isto pode ser devido ao fato de que a avaliação da testemunha tenha sido realizada após 18h, enquanto que nos tratamentos com fungicida o período de incubação foi de 28h. A necessidade de realizar a avaliação em menos tempo na ausência do fungicida se deve ao crescimento exagerado das hifas que impede a confirmação da germinação de cada conídio individualmente pela sobreposição de tubos germinativos e hifas na placa, prejudicando a visualização e a precisão das avaliações (GOETTEL; INGLIS, 1997). A possibilidade de incubação por mais tempo na presença do fungicida permite que a viabilidade

dos conídios que apresentam germinação lenta seja confirmada, o que resulta em valores superiores de porcentagem de viabilidade.

A validação do método desenvolvido utilizando-se produtos comerciais à base dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em diferentes formas e formulações comprovou a aplicabilidade e maior facilidade de sua utilização para análises experimentais e de produtos microbianos. Um dos principais problemas dos métodos existentes para determinação de viabilidade é a grande variabilidade dos resultados. Por isso, a variância e o coeficiente de variação dos ensaios foram utilizados como parâmetro de comparação da variabilidade existente em cada avaliação, sem levar em consideração os valores de viabilidade. Uma maior porcentagem de germinação revelada por um método não significa que este método seja melhor em relação a outro.

O método desenvolvido no presente trabalho apresentou maior precisão em todas as avaliações realizadas quando comparado com as técnicas de avaliação da viabilidade Padrão e UFC. Em relação ao método Padrão, isto pode ser devido à maior uniformidade na deposição dos conídios pela transferência da gota da suspensão na superfície do meio de cultura não havendo a necessidade de escolha de campos para contagem no método Novo, em comparação com o espalhamento mais desuniforme que se consegue com a alça de Drigalski. Assim, no momento da avaliação, focando-se qualquer lugar dentro dos campos delimitados na placa Rodac é possível se observar relativamente o mesmo espalhamento e condições para avaliação. No método Padrão, o que ocorre é a distribuição não uniforme dos conídios com a aglomeração em alguns pontos e a ausência em outros locais na superfície do meio. A necessidade de se localizar arbitrariamente pontos com concentrações de conídios adequadas durante a contagem torna o processo mais demorado e pode interferir no resultado final da análise

Em relação ao método de UFC, o método Novo apresentou menor variabilidade principalmente pelo fato de que em UFC o resultado é bastante influenciado por erros na pesagem. Mesmo utilizando-se uma balança de precisão e tomando-se o máximo de cuidado possível, pequenas variações entre as amostras podem acarretar em grandes diferenças nos resultados finais. Isto ocorre pois quando se utiliza a técnica de UFC os resultados obtidos são gerados a partir de dados de contagem de colônias possuindo assim muita variação entre as repetições, o que gera imprecisões e dificuldade na replicabilidade dos dados.

Uma das limitações da técnica de UFC é quanto às análises de produtos formulados, principalmente em óleo emulsionável. Como observado no presente estudo, esta técnica subestima a concentração final de conídios viáveis neste tipo de produto, provavelmente pelo fato de que conídios que permanecem unidos após o plaqueamento formam apenas uma colônia (JENKINS; GRZYWACZ, 2000; STENTELAIRE et al., 2001). Estudos realizados por Jaronski e Liebmann (2000) também verificaram este efeito em um produto a base de *B. bassiana* formulado em óleo emulsionável, o qual teve a concentração final de conídios subestimada em 50% pelo método de UFC. O mesmo problema foi constatado pelos autores para uma formulação em Pó molhável, cuja concentração final foi subestimada em 58%. No presente trabalho esta formulação também teve sua quantificação subestimada pelo método de UFC, tanto para *B. bassiana* quanto para *M. anisopliae*, confirmando os resultados obtidos pelos autores acima citados. Algumas empresas que comercializam formulações de fungos em Pó molhável defendem a utilização da técnica de UFC para análises de viabilidade, pois alegam a existência de outras estruturas infectivas nestes produtos, as quais poderiam vir a formar colônias, mas que não são constatadas pelo método direto. No entanto, como já apresentado, a quantificação dos produtos em Pó molhável teve os resultados subestimados, não sendo verificada a ocorrência destas estruturas infectivas. Desta forma, não se recomenda a utilização do método de UFC para análises de viabilidade de produtos puros ou formulados. O uso de UFC é útil apenas para avaliações experimentais quando o fungo se encontra em substratos como solo por exemplo (KESSLER et al, 2004; SHIMAZU; MAEHARA; SATO, 2002), pois neste caso a técnica de avaliação direta não poderia ser aplicada.

A técnica de fluorescência foi bastante precisa para a avaliação de Conídios puros dos isolados avaliados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, corroborando as recomendações feitas por outros autores (FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990; SCHADING et al., 1995). No entanto, apesar de demonstrar pouca variação também para Arroz+fungo e Pó molhável, a avaliação destes produtos se mostrou muito mais laboriosa do que quando realizada pelo método Novo. Outras partículas existentes nos produtos são coradas dificultando a visualização e a distinção entre os conídios viáveis e inviáveis. Para os produtos em óleo emulsionável de ambos os fungos a avaliação utilizando-se os fluorocromos não foi possível, pois o óleo dificultou a mistura do corante possivelmente impossibilitando a penetração deste na maioria dos conídios. Assim, não se recomenda utilizar o método de fluorescência para análises de produtos formulados

ou que contenham muitos resíduos de produção. Além disso, para sua utilização os fluorocromos requerem um maior cuidado na manipulação, pois são bastante tóxicos.

De maneira geral, as maiores dificuldades são encontradas nas análises de viabilidade de produtos formulados em óleo. Principalmente para espécies que possuem conídios redondos e pequenos (como *B. bassiana* por exemplo), pois o óleo pode formar minúsculas gotas na superfície do meio de cultura, as quais são difíceis de se distinguir de conídios não germinados (GOETTEL; INGLIS, 1997). Além disso, alguns conídios podem ficar contidos dentro de gotas maiores formadas pelo óleo não entrando em contato com o meio de cultura, o que pode atrasar ou até mesmo inibir o início do processo germinativo. Quando o produto em óleo se encontra diluído em água antes do tratamento no campo, a chamada suspensão de aplicação, esta avaliação da viabilidade se torna ainda mais difícil. Após o contato com a água e formação da emulsão, agravado pela hidrofobicidade particular de cada fungo, o óleo se desfaz em minúsculas gotículas, sendo que os problemas já citados anteriormente para o produto puro em óleo são mais acentuados neste caso.

Por isso, o método Novo apresenta vantagens em relação aos demais, pois considera as características de cada formulação. A etapa principal é a remoção de grande parte do óleo antes do plaqueamento, que facilita a visualização dos conídios no momento da avaliação. No caso da viabilidade da suspensão de aplicação, este método se mostra inédito, pois não existem protocolos ou recomendações na literatura para análises desta natureza.

Outros benefícios da utilização do método desenvolvido em relação aos demais métodos testados é a economia de meio de cultura e de espaço físico devido ao menor tamanho da placa utilizada para avaliação. No método Padrão utiliza-se três vezes mais meio em cada repetição, e no caso de UFC, além do maior tempo de incubação (de 5 a 10 dias), a quantidade de meio é de quatro a cinco vezes maior do que a utilizada no método Novo. Extrapolando-se para a realidade encontrada na rotina dos laboratórios de produção e de pesquisas com entomopatógenos, a soma desta economia em todos os aspectos pode ser bastante significativa.

Os resultados apresentados demonstram que o método desenvolvido para determinação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos puros ou em produtos formulados é efetivo, de fácil execução e em geral apresenta maior precisão do que as outras técnicas avaliadas. Além disso, a técnica para determinação de viabilidade em suspensão de aplicação constitui-se com uma

ferramenta importante para estudos da influência de fatores bióticos e abióticos no período de pré-aplicação dos fungos em campo.

Referências

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2. ed. 1998. cap. 20, p. 637-712.

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2. ed., 1998. cap. 23, p. 765-778.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2. ed. 1998. cap. 27, p. 845-870.

BLACK, J. G. Terapia Antimicrobiana. In: _____. **Microbiologia**: Fundamentos e Perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2002. cap 13, p. 316-342.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidial. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 151-160, 1983.

DEVI, U.K.; SRIDEVI, V.; MOHAN, C.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, p. 181–189, 2005.

FARIA, M.R.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 346–354, 2009.

FIRSTENCEL, H.; BUTT, T.M.; CARRUTHERS, R.I. A Fluorescence microscopy method for determining the viability of Entomophthoralean fungal spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 258-264, 1990.

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1309-1312, 2006.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**, San Diego: Academic Press, 1997. chap. 5-3, p. 213-250.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and Temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 261–266, 1999.

IBRAHIM, L.; BUTT, T.M.; JENKINSON, P. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae.* **Mycological research**, Cambridge, v. 106, n. 6, p. 705-715, 2002.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 35-50, 1996.

ISKANDAROV, U.S.; GUZALOVA, A.G.; DAVRANOV, K.D. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae.* **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 72–76, 2006.

JACKSON, A.M.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 494-501, 1991.

JAMES, R.R. Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the silverleaf whitefly for two hyphomycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. **77,** p. 99–107, 2001.

JARONSKI, S.; LIEBMANN, J. Direct spore counts vs. colony forming unit counts as methods for quantifying viable *Beauveria bassiana* conidia. In: Annual meeting of the society for invertebrate pathology, 2000, University of Guanajuato, Mexico. **Proceedings of the annual meeting of the society for invertebrate pathology**. Guanajuato, Mexico, p. 13-18, 2000.

JENKINS, N.E.; GRZYWACZ, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, p. 753-777, 2000.

JIMENEZ, J.; GILLESPIE, A.T. Use of the optical brightener Tinopal BOPT for the rapid determination of conidial viabilities in entomogenous deuteromycetes. **Mycological research**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 279-283, 1990.

JONES, K.H.; SNEFT, J.A. **Fungal spores:** their liberation and dispersal. Oxford: Clarendon Press, 1985. 302p.

KESSLER, P.; ENKERLI, J.; SCHWEIZER, C.; KELLER, S. Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. **BioControl**, Dordrecht, v. 49, p. 563–581, 2004.

LANE, B.S.; TRINCI, A.P.J.; GILLESPIE, A.T. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens.* **Mycological research**, Cambridge, v. 95, n. 7, p. 829-833, l991.

MEIER, R; CHARVAT, I. Reassessement of tetrazolium bromide as a viability stain for spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 80, n. 9, p. 1007–1015, 1993

MILNER, R.J.; HUPPATZ, R.J.; SWARIS, S.C. A New method for assessment of germination of *Metharizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 57, p. 121-123, 1991.

RANGEL, D.E.N; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 87, p. 77-83, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**. User's Guide. Versão 9.1.3, Cary, NC, USA. 2002/2003.

SCHADING, R.L.; CARRUTHERS, R.I.; MULLIN-SCHADING, B.A. Rapid determination of conidial viability for entomopathogenic Hyphomycetes using fluorescence microscopy techniques. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 201-208, 1995.

SHIMAZU, M.; MAEHARA, N.; SATO, H. Density dynamics of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) introduced into forest soil, and its influence on other soil microorganisms. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 37, n. 2, p. 263–269, 2002.

STENTELAIRE, C.; ANTOINE, N.; CABROL, C.; FERON, G.; DURAND, A. Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, p. 560–566, 2001.

SUTHERLAND, E.D.; COHEN, S.D. Evaluation of tetrazolium bromide as a vital stain for fungal oospores. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 1532–1535, 1983.

ZIMMERMAN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 40, p. 36-40, 1982.

3 EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO NA VIABILIDADE E VIRULÊNCIA DOS FUNGOS *BEAUVERIA BASSIANA* E *METARHIZIUM ANISOPLIAE* NA FORMA DE CONÍDIOS SECOS NÃO FORMULADOS E FORMULADOS

Resumo

A influência da temperatura e do tempo de exposição das suspensões de aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na viabilidade e virulência dos fungos foi determinada em condições de laboratório. Os fungos foram usados na forma de Conídios puros, Arroz+fungo e nas formulações Pó molhável e Suspensão concentrada em óleo emulsionável. As suspensões foram mantidas a 26°C, 36°C e 46°C, durante 1h, 4h e 6h. Em cada experimento, foram preparadas 4 suspensões independentes (repetições) dos produtos, as quais foram distribuídas em tubos de centrífuga e incubadas nas respectivas temperaturas durante os períodos citados.Amostras das suspensões foram então plaqueadas para avaliação da viabilidade, e também pulverizadas em lagartas de *Diatraea saccharalis* afim de se avaliar a virulência dos fungos. Em outro experimento compararam-se os efeitos da temperatura na viabilidade de conídios puros e formulados em óleo emulsionável, obtendo-se curvas de sobrevivência de conídios. Verificou-se que de maneira geral, o aumento da temperatura afetou negativamente a germinação e eficiência dos fungos testados, e este aumento foi proporcional ao tempo de exposição às temperaturas. A formulação em óleo emulsionável apresentou proteção aos efeitos detrimentais da temperatura. Mesmo após 6h de exposição à temperatura de 36°C a viabilidade se manteve acima dos 85% para ambos os fungos avaliados. Esta formulação também apresentou os melhores resultados de mortalidade dos insetos, atingindo mesmo após 4h de exposição a 46°C 39% e 50% de eficiência para *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente. O fungo *M. anisopliae* demonstrou-se mais sensível à temperatura do que *B. bassiana*, apresentando maiores reduções na viabilidade dos conídios (após 12h de exposição a 36°C a viabilidade dos conídios puros foi reduzida em 13%, contra 5% de redução em *B. bassiana*). Os resultados demonstraram que a formulação em óleo emulsionável de ambos os fungos é recomendável para o controle de *D. saccharalis*, pois protege os fungos dos efeitos adversos da temperatura resultando em maiores mortalidade do que as outras formas dos fungos avaliadas.

Palavras chave: *Diatraea saccharalis*; Fungos entomopatogênicos; Formulação em óleo; Pó molhável.

EFFECT OF TEMPERATURE AND TIME OF EXPOSURE ON THE VIABILITY AND VIRULENCE OF *BEAUVERIA BASSIANA* AND *METARHIZIUM ANISOPLIAE* IN DRIED UNFORMULATED CONIDIA AND FORMULATED CONIDIA

Abstract

The influence of temperatures and time of exposure on viability and virulence of suspensions of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* were evaluated under laboratory conditions. The fungi were used as pure conidia, Rice plus fungus, in wettable powder and emulsifiable oil formulation. Conidia suspensions were maintained at 26°C, 36°C and 46°C for 1h, 4h and 6h. Four independent suspensions (repetitions) were prepared in each experiment

which were placed in centrifuge tubes and incubated under the respective temperatures during the periods cited. Aliquots of suspensions were then plated to determine viability, and were also sprayed onto larvae of *Diatraea saccharalis* in order to evaluate the fungi virulence. In another experiment, the effects of temperature on the viability of pure dry conidia and formulated conidia in emulsifiable oil were compared. In general, the temperature increase negatively affected the germination and fungi efficiency, and this relationship was proportional to the duration of exposure to temperature. The emulsifiable oil formulation was the least affected by the detrimental effects of heat for both fungi. Even after 6 hours of exposure to temperature of 36°C, the viability remained above 85% for both species evaluated. This formulation also showed the best results of mortality the insect, and even after 4h of exposure to 46°C the efficiency was 39% and 50% for *B. bassiana M. anisopliae*, respectively. *M. anisopliae* was more sensitive to the effect of temperature than *B. bassiana*, presenting greater reductions on the conidial viability (after 12h of exposure to 36 ° C the viability of pure conidia was reduced by 13% compared to 5% reduction in *B. bassiana*). The results showed that the formulation in emulsifiable oil of both fungi is recommended for control of *D. saccharalis*, because it protects the fungi from the adverse effects of temperature resulting in higher mortality than other forms of fungi tested.

Keywords: *Diatraea saccharalis*; Entomopathogenic fungi; Oil formulation; Wettable powder

3.1 Introdução

Embora os fungos entomopatogênicos tenham grande potencial como agentes de controle biológico, poucas espécies têm sido produzidas e utilizadas em escala comercial (LACEY; GOETTEL, 1995). Dentre os produtos existentes ou que estão atualmente em desenvolvimento, destacam-se aqueles à base dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae), os quais são os agentes de controle microbiano mais utilizados na América Latina, representando juntos mais de 60% deste mercado (ALVES et al.; 2008; FARIA; WRAIGHT, 2007).

Para aumentar a eficiência destes patógenos e o seu desempenho sob condições ambientais adversas, melhorando consequentemente sua aceitação por parte dos produtores, algumas medidas podem ser adotadas (LACEY et al., 2001). A formulação dos fungos pode trazer estes benefícios, pois além de facilitar a aplicação, pode aumentar a vida útil de prateleira (pré-preparação) e a persistência no ambiente (HONG et al., 2005; WRAIGHT; JACKSON; DEKOCK, 2001).

Estes ganhos em proteção são muito importantes, pois apesar da boa eficiência apresentada pelos fungos entomopatogênicos, sua eficácia em campo é extremamente dependente das condições ambientais (ALVES, 1998; ZIMMERMAN et al., 1982). Muitos fatores abióticos

podem afetar a sobrevivência e a capacidade infectiva destes fungos, sendo que a radiação solar, umidade relativa e temperatura são consideradas os mais importantes (BUGEME et al., 2008; INYANG et al, 2000).

Por este motivo, vários estudos foram realizados para determinar os efeitos de fatores abióticos nos parâmetros biológicos dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em condições de laboratório e campo (BRAGA et al., 2001; BROOKS et al., 2004; BUGEME et al., 2009; HUANG; FENG, 2009; LAZZARINI, ROCHA; LUZ, 2006; MOORE; HIGGINS; LOMER, 1996; PERFETTI; MORENO; QUINTERO, 2007; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2004; SOSA-GOMEZ; ALVES, 2000; THOMPSON; BRANDENBURG; ARENDS, 2006;YEO et al., 2003;).

Dentre as formulações existentes, a formulação em óleo é a que tem apresentado os melhores resultados de proteção para os fatores já citados, principalmente para a radiação solar UV (ALVES; BATEMAN; PRIOR, 1998; HEDIMBI et al., 2008; INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1995; MOORE et al., 1993) e para temperatura (DAOUST; WARD; ROBERTS, 1983; McCLATCHIE et al., 1994; STARTHERS; MOORE; PRIOR, 1993). Porém, nos trabalhos existentes na literatura esta proteção à temperatura tem sido estudada somente ao nível de armazenamento na forma de produtos puros formulados em óleo, e não quando estes se encontram misturados na água para aplicação simulando as condições encontradas no campo durante o tratamento da lavoura. . Em condições tropicais, durante a primavera e verão quando se concentram as aplicações de micoinseticidas, são comuns temperaturas acima dos 30°C. A temperatura no tanque de preparação exposto ao sol por períodos prolongados, pode atingir valores muito elevados, inviabilizando os conídios, embora isto ainda não tenha sido quantificado.

Desta forma, faz-se necessária a realização de estudos que determinem o efeito da temperatura sobre a efetividade destes fungos entomopatogênicos, quando a suspensão de aplicação já está preparada. O tempo em que o fungo fica suspenso antes da aplicação também pode interferir indiretamente, pois os conídios ficam mais expostos às condições de temperatura que estão submetidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura no período de pré-aplicação na eficácia dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* formulados ou não.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos no setor de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP. Os isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados no trabalho foram: ESALQ-PL63 de *B. bassiana* e ESALQ-1037 de *M. anisopliae*, produzidos e fornecidos pela empresa Itaforte Bioprodutos®, nas formas de Conídios Puros (EP) e Arroz+fungo (AF), e também nas formulações Pó molhável (WP) e Suspensão concentrada em óleo (vegetal) emulsionável (SC), oriundos de um mesmo lote de produção, para cada fungo, sendo armazenados em freezer a -15°C, com exceção dos formulados em óleo que foram mantidos até o momento da utilização em geladeira a 4°C. Para todos os produtos a umidade dos conídios foi medida logo após a produção, com o auxílio de um medidor portátil Hygron DG (Gehaka), sendo padronizada em aproximadamente 7%.

3.2.1 Efeito do período de exposição e da temperatura na viabilidade e virulência da suspensão de aplicação ("calda") de diferentes produtos/formulações

A viabilidade dos conídios e a mortalidade ocasionada por estes em lagartas de *D. saccharalis* foram utilizadas como parâmetros de avaliação da influência do período entre a preparação da suspensão e a aplicação e da temperatura na eficiência dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Para cada um dos produtos/formulações foi realizado um experimento independente totalizando 8 experimentos.

Foram tomadas amostras independentes dos produtos preparando-se quatro suspensões de $1{,}25\times10^{8}$ conídios/mL (repetições) distintas de 500 mL, em solução de 0,05% Tween 80 a 22°C. As suspensões foram preparadas em frascos tipo Schott (de 1000 mL), homogeneizando-se vigorosamente por 20 min., sendo posteriormente, divididas em tubos plásticos de 50 mL (Falcon) os quais foram incubados em estufas tipo B.O.D. (24h fotofase) sob as temperaturas de 26 ± 1ºC, 36 ± 1ºC e 46 ± 1ºC, por zero, 1, 4 e 6h, totalizando 40 tubos (12 por temperatura + 4 do tempo zero).

As avaliações consistiram na retirada de amostras independentes e as suspensões que continham Conídios puros, Arroz+fungo e Pó molhável foram plaqueadas para determinação da viabilidade como descrito no item 2.2.1, fazendo-se 3 placas por tubo, sendo 12 para cada

temperatura/tempo, incubando-se por 28h em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h) até a avaliação. Nas suspensões que continham a formulação em óleo emulsionável foram adotados os procedimentos descritos no item 2.2.3 antes do plaqueamento.

A cada período de avaliação, utilizando-se uma Torre de Potter (Burkard Manufacturing; calibrada a 15 lb pol-2), uma amostra de 2 mL de cada suspensão foi pulverizada em grupos de 50 lagartas de terceiro ínstar, e estas foram divididas em 5 repetições de 10 lagartas para cada tratamento. As lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) utilizadas nos bioensaios foram obtidas a partir da criação mantida no mesmo laboratório, em dieta artificial (HENSLEY; HAMMOND, 1968), estando esta isenta de contaminações por microsporídios (*Nosema* sp.; Microsporidia: Nosematidae). Na testemunha foi pulverizado apenas a solução de Tween 80, e a testemunha dos experimentos com SC as lagartas foram pulverizadas com esta solução acrescida da mesma quantia de óleo existente no tratamento. Passados 2 min. após a pulverização, as lagartas foram transferidas para placas de petri de plástico (60×15 mm) contendo papel filtro na tampa e dieta para alimentação (a mesma da criação, porém isenta de anticontaminantes), incubando-se em B.O.D. (26 ± 2°C, fotofase de 14h).

Diariamente, foi realizada a troca da dieta e a avaliação da mortalidade durante 10 dias para *B. bassiana,* e 12 dias para *M. anisopliae*, sendo as lagartas mortas colocadas em câmara úmida para confirmação do agente causal.

3.2.2 Curva de sobrevivência ao longo do tempo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de conídios puros ou formulados em óleo emulsionável

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior, foi desenvolvido outro estudo mais detalhado para avaliar a perda de viabilidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na formulação de Suspensão concentrada em óleo emulsionável em comparação com Conídios puros.

Os tratamentos foram mantidos durante 12h de incubação, sob as temperaturas de 26 ± 1ºC, 36 ± 1ºC e 46 ± 1ºC. Assim, para cada fungo foram preparadas quatro diferentes suspensões (repetições) de amostras independentes dos produtos, As suspensões foram feitas em solução de 0,05% de Tween 80 a 22°C, as quais foram divididas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e incubadas nas respectivas temperaturas em estufas tipo B.O.D. (24h de fotofase) monitorando-se as temperaturas com um Data Logger Perceptec® modelo DHT-2220. Para as temperaturas de 26

e 36ºC as avaliações foram realizadas após zero, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12h. Para as suspensões incubadas a 46ºC, realizaram-se as avaliações após zero, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 7, 9 e 12h, sendo preparada uma placa por tubo em cada período de avaliação.

Em cada avaliação, as suspensões foram plaqueadas e avaliadas conforme descrito no item 2.2.1. As suspensões que continham a formulação SC passaram pelos passos descritos no item 2.2.3.

3.2.3 Análises estatísticas

Os experimentos do item 3.2.1 foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, em um arranjo fatorial (3×3), e os dados analisados pelo teste F, comparando-se as médias entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) na presença de interação. As médias obtidas no tempo zero foram comparadas às demais por contrastes ortogonais (P<0,05), e a correlação entre os parâmetros viabilidade de conídios e mortalidade ocasionada em lagartas foi obtida pelo índice de Pearson (P<0,05).

Os dados de mortalidade obtidos foram transformados por $\text{arcsen}\sqrt{x/100}$, sendo que para *M. anisopliae* utilizou-se a mortalidade confirmada, e para *B. bassiana* a mortalidade avaliada foi a total devido ao alto índice de canibalismo de lagartas mortas pelo fungo. Neste caso a mortalidade foi corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli (ALVES et al., 2005). Os experimentos do item 3.2.2 foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, fazendo-se a análise de regressão dos dados. Todas as análises foram feitas com o programa estatístico SAS (SAS, 2003).

3.3 Resultados

3.3.1 Efeito do período de exposição e da temperatura na viabilidade e virulência da suspensão de aplicação do fungo *Beauveria bassiana*.

A temperatura e o tempo de exposição influenciaram significativamente a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* em todas as formas testadas (Tabela 1).

O fungo na forma de Conídios puros não sofreu redução na viabilidade após 1h de exposição a 26ºC e 36ºC. Após 6h, mesmo apresentando redução a viabilidade se manteve com valores consideravelmente altos, de 94,2% inicialmente caindo para 90% a 26ºC e 87,6% a 36ºC.

Em Arroz+fungo somente o tratamento exposto por 1h a 26ºC não apresentou diminuição significativa da germinação, mantendo-se com 88,2% contra 90,5% da viabilidade inicial.

No caso da formulação Pó molhável, todas as temperaturas reduziram a viabilidade do fungo já com 1h de exposição. A temperatura de 46ºC foi a que apresentou o maior efeito sobre a germinação para Conídios puros, Arroz+fungo e Pó molhável, reduzindo a viabilidade após 6h de exposição para 1,2 %, 4,9% e 1,1% respectivamente.

A formulação em óleo emulsionável não teve a viabilidade reduzida mesmo após 4h e 6h de exposição às temperaturas de 26ºC e 36ºC, revelando a proteção oferecida por esta formulação aos efeitos da temperatura na sobrevivência dos conídios. A 46ºC a redução ocorreu somente após 4h, tendo a viabilidade atingido os 30,7% com 6h de incubação, valores estes muito maiores do que os observados nas outras formas do fungo testadas

Nas análises de comparações entre as temperaturas e os tempos de exposição (1h, 4h e 6h) verificou-se interação significativa entre estes fatores em todas as formas do fungo avaliadas (EP $F_{8, 27}$ = 2904,3; P<0,0001; AF $F_{8, 27}$ = 667,4; P<0,0001; WP $F_{8, 27}$ = 927,7; P<0,0001; SC $F_{8, 27}$ = 113,6; P<0,0001).

Os resultados desta análise seguiram a mesma tendência apresentada nas comparações com a viabilidade inicial realizada por contrastes. Dentre as informações complementares constatadas, ressalta-se que as suspensões de todas as formas/formulações mantidas por 1h nas três temperaturas não apresentaram diferenças significativas na viabilidade entre si. Ou seja, se uma aplicação no campo com o fungo em uma das formas testadas demorará 1h, o efeito na viabilidade torna-se indiferente se a temperatura estiver entre 26ºC e 46ºC.

Nas análises a proteção à temperatura oferecida pela formulação em óleo emulsionável foi confirmada, pois não se observou diferença significativa entre os diferentes períodos de exposição nas temperaturas de 26ºC e 36ºC ($F_{2, 9}$ = 1,94, P=0,1632; $F_{2, 9}$ = 2.65, P=0,0892, respectivamente).

Tabela 1 - Viabilidade (%) de suspensões de *Beauveria bassiana* mantidas em diferentes temperaturas por 1, 4 e 6 horas

Fungo	Tempo	Viabilidade (%)		
		26ºC	36ºC	46ºC
Conídios puros	**0**		94,2 ± 0,5	
	1 h	93,1 ± 0,1 A a [ns]	93,2 ± 0,5 A a [ns]	91,3 ± 0,4 A a
	4 h	91,9 ± 0,1 AB a	87,8 ± 1,1 B b	0,8 ± 0,2 B c
	6 h	90,0 ± 0,4 B a	87,6 ± 0,7 B a	1,2 ± 0,6 B b
Arroz+fungo	**0**		90,5 ± 0,3	
	1 h	88,2 ± 0,6 A a [ns]	87,8 ± 0,6 A a	85,8 ± 0,5 A a
	4 h	86,3 ± 0,9 A a	81,0 ± 0,9 B b	16,2 ± 1,4 B c
	6 h	82,5 ± 0,8 A a	80,6 ± 1,4 B a	4,9 ± 0,4 C b
Pó molhável	**0**		89,4 ± 0,8	
	1 h	87,3 ± 0,4 A a	87,5 ± 1,2 A a	86,7 ± 0,6 A a
	4 h	84,8 ± 0,9 AB a	79,5 ± 0,7 B b	2,7 ± 0,4 B c
	6 h	82,0 ± 1,5 B a	70,7 ± 0,6 C b	1,1 ± 0,4 B c
Suspensão concentrada em óleo emulsionável	**0**		90,0 ± 1,2	
	1 h	92,0 ± 0,5 A a [ns]	91,4 ± 0,6 A a [ns]	90,2 ± 1,2 A a [ns]
	4 h	90,5 ± 0,7 A a [ns]	86,2 ± 1,9 A a [ns]	37,4 ± 2,4 B b
	6 h	87,5 ± 0,6 A a [ns]	87,8 ± 0,7 A a [ns]	30,7 ± 3,4 B b

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada preparação do fungo, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05). [ns] Não apresentam diferença significativa em relação ao tempo zero, segundo comparações individuais por contrastes ortogonais (P<0,05); todas as outras comparação foram significativas em relação ao tempo zero. Coeficiente de variação dos ensaios (EP=1,5%; AF=2,5%; WP=2,6%; SC=4,3%).

A temperatura, principalmente 46ºC, e o tempo de exposição influenciaram a mortalidade total ocasionada em lagartas de *D. saccharalis* pelo fungo *B. bassiana* em todas as formas testadas (Tabela 2). O fungo na forma de Arroz+fungo apresentou piores resultados em detrimento aos encontrados em Conídios puros, Pó molhável e Suspensão Concentrada em óleo emulsionável. Diferentemente das demais preparações do fungo, em Arroz+fungo à 26ºC a mortalidade foi reduzida após 6h de exposição, de 69,5% para 48,4%. À 36ºC a redução ocorreu logo às 4h de exposição. Para todas as formas do fungo testadas a temperatura de 46ºC só não reduziu a eficiência do fungo nos tratamentos com 1h de exposição.

Nas análises de comparações entre as temperaturas e os tempos de exposição (1h, 4h e 6h), em todas as diferentes preparações constataram-se interações significativas entre os fatores (EP $F_{8, 27}$ = 6,08; P=0,0013; AF $F_{8, 27}$ = 3,63; P=0,0171; WP $F_{8, 27}$ = 4,7; P=0,0052; SC $F_{8, 27}$ = 8,45; P=0,0001).

Quando submetidas a 26ºC e 36ºC por até 6h, não foram observadas diferenças na mortalidade ocasionada nas lagartas em nenhuma das diferentes formas do fungo testadas. Apenas na temperatura de 46ºC, em todos os casos, foi verificada redução significativa após os períodos de 4h e 6h de exposição em relação à 1h.

Não foi observado um efeito substancial das diferentes formulações no aumento da resistência à temperatura, entretanto, as porcentagens de mortalidades observadas nas aplicações da formulação em óleo emulsionável foram relativamente superiores àquelas encontrados nos tratamentos com outras formulações. Mesmo após 4h de incubação à 46ºC obtiveram-se valores próximos aos 40% de eficiência, e no mesmo período à 36ºC a eficiência foi de aproximadamente 90%.

As correlações entre a viabilidade do fungo em cada preparação e a mortalidade causada nos insetos respectivamente, foram significativas para todos os produtos segundo o índice de Pearson (EP=0,911, P=0,0002; AF=0,747, P=0,0130; WP=0,925, P=0,0001; SC=0,951, P<0,0001), demonstrando que a relação positiva entre as variáveis. Porém, observa-se que valores extremamente baixos de viabilidade podem resultar em porcentagens de mortalidade consideráveis, como por exemplo, na suspensão de Conídios puros do tratamento incubado à 46ºC por 4h, a qual apresentou em média 0,8% de viabilidade (Tabela 1) e 18,4% de mortalidade nos bioensaios (Tabela 2). Em contrapartida, a viabilidade apresentada em Arroz+fungo à 46ºC no mesmo período foi de 16,2% em média, causando 18,5% de mortalidade.

Tabela 2 - Mortalidade (%) total de lagartas de *Diatraea saccharalis* causada por suspensões de conídios de *Beauveria bassiana* que foram incubadas por 1, 4 e 6 horas em diferentes temperaturas

Fungo	**Tempo**	**Mortalidade (%)**		
		26ºC	**36ºC**	**46ºC**
Conídios puros	**0**		61,7 ± 4,8	
	1 h	71,9 ± 4,8 A a ^{ns}	59,2 ± 5,8 A a ^{ns}	48,9 ± 5,8 A a ^{ns}
	4 h	79,6 ± 5,8 A a ^{ns}	51,5 ± 13,1 A a ^{ns}	18,4 ± 4,1 B b
	6 h	56,6 ± 8,5 A a ^{ns}	43,9 ± 6,5 A a	0,0 ± 0,0 B b
Arroz+fungo	**0**		69,5 ± 5,7	
	1 h	71,3 ± 3,2 A a ^{ns}	51,1 ± 8,7 A a ^{ns}	70,1 ± 8,5 A a ^{ns}
	4 h	53,8 ± 7,5 A a ^{ns}	40,2 ± 8,7 A ab	18,5 ± 2,9 B b
	6 h	48,4 ± 7,5 A a	34,8 ± 4,1 A ab	10,3 ± 4,8 B b
Pó molhável	**0**		85,0 ± 6,5	
	1 h	65,0 ± 8,7 A a ^{ns}	72,5 ± 2,5 A a ^{ns}	65,0 ± 6,5 A a ^{ns}
	4 h	75,0 ± 6,5 A a ^{ns}	55,0 ± 8,7 A a ^{ns}	25,0 ± 6,5 B b
	6 h	75,0 ± 10,4 A a ^{ns}	45,0 ± 6,5 A ab	15,0 ± 2,9 B b
Suspensão concentrada em óleo emulsionável	**0**		100,0 ± 0,0	
	1 h	97,2 ± 2,5 A a ^{ns}	91,7 ± 4,8 A a ^{ns}	88,9 ± 4,1 A a ^{ns}
	4 h	79,7 ± 7,9 A a ^{ns}	88,9 ± 5,8 A a ^{ns}	38,9 ± 10,4 B b
	6 h	83,3 ± 6,5 A a ^{ns}	69,4 ± 6,3 A a	15,5 ± 2,9 C b

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada preparação do fungo, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05). ^{ns} Não apresentam diferença significativa em relação ao tempo zero, segundo comparações individuais por contrastes ortogonais (P<0,05); todas as outras comparação foram significativas em relação ao tempo zero. Para análise, a mortalidade foi corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli. Coeficiente de variação dos ensaios (EP=12,3%; AF=11,1%; WP=13,0%; SC=16,5%).

3.3.2 Efeito do período de exposição e da temperatura na viabilidade e virulência da suspensão de aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*.

A temperatura e o tempo de exposição influenciaram significativamente a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* em todas as formas testadas (Tabela 3). Na forma de Conídios puros, somente no tratamento mantido por 1h à temperatura de 26ºC não ocorreu redução na viabilidade. Nos mantidos por 4h e 6h à 26ºC e em todos os períodos de exposição das temperaturas de 36ºC e 46ºC houve diminuição da viabilidade dos conídios. Em Arroz+fungo, as temperaturas de 26ºC, 36ºC e 46ºC reduziram significativamente a viabilidade inicial do fungo após 1h de exposição, caindo de 78,4% para 73,6%, 69,7% e 63,1%, respectivamente. Para o fungo na formulação Pó molhável, nenhuma temperatura ocasionou queda na porcentagem de germinação após 1h de exposição.

À exemplo do verificado em *B. bassiana*, a proteção conferida pela formulação em óleo emulsionável aos efeitos da temperatura sobre a germinação dos conídios foi expressiva. Sob a temperatura de 46ºC detectou-se redução na viabilidade inicial de 92,8% somente após os períodos de 4h (47%) e 6h (22,5%) de exposição.

Nas comparações entre as temperaturas e os tempos de exposição (1h, 4h e 6h) do fungo *M. anisopliae* também ocorreu interação significativa nas análises entre os fatores para EP ($F_{8, 27}$ = 886,84; P<0,0001), AF ($F_{8, 27}$ = 348,0; P<0,0001), e nas formulações WP ($F_{8, 27}$ = 752,11; P<0,0001) e SC ($F_{8, 27}$ = 24,33; P<0,0001). Por meio desta análise foi possível observar, em cada preparação do fungo, diferenças entre os períodos de avaliação, constatando-se que de maneira geral quanto menor a temperatura e o tempo de exposição, maior a viabilidade (entre linhas e entre colunas, Tabela 3).

Em todas as formas do fungo avaliadas a maior influência sobre a viabilidade foi observada nos períodos de 4h e 6h de exposição à temperatura de 46ºC. Vale salientar que para formulação em óleo emulsionável, devido à proteção já comentada anteriormente, não foi possível observar diferenças estatísticas nas reduções de viabilidade nas temperaturas de 26ºC e 36ºC ($F_{2, 9}$ = 0,08, P=0,9188; $F_{2, 9}$ = 0,14, P=0,8702, respectivamente) entre nenhum dos períodos avaliados. Na temperatura de 46ºC, após 4h de exposição os valores de viabilidade mantiveram-se próximos aos 50%, evidenciando que mesmo em temperaturas mais elevadas este efeito pôde ser observado.

Tabela 3 - Viabilidade (%) de suspensões de *Metarhizium anisopliae* mantidas em diferentes temperaturas por 1, 4 e 6 horas

Fungo	Tempo	Viabilidade (%)		
		26ºC	36ºC	46ºC
Conídios puros	0		93,7 ± 0,8	
	1 h	92,7 ± 0,4 A a [ns]	89,9 ± 0,7 A ab	86,1 ± 1,1 A b
	4 h	89,1 ± 0,3 A a	75,3 ± 0,7 B b	1,12 ± 0,4 B c
	6 h	83,4 ± 0,8 B a	67,3 ± 1,7 B b	0,7 ± 0,1 B c
Arroz+fungo	0		78,4 ± 0,3	
	1 h	73,6 ± 0,9 A a	69,7 ± 0,4 A a	63,1 ± 1,5 A b
	4 h	72,4 ± 1,1 AB a	61,5 ± 1,7 B b	2,0 ± 0,3 B c
	6 h	68,6 ± 0,9 B a	56,5 ± 0,9 C b	0,55 ± 0,1 B c
Pó molhável	0		63,2 ± 0,7	
	1 h	65,1 ± 0,6 A a	64,2 ± 0,7 A a [ns]	62,7 ± 0,6 A a [ns]
	4 h	59,5 ± 0,6 B a	53,8 ± 0,6 B b	0,6 ± 0,4B c
	6 h	48,3 ± 0,7 C a	43,4 ± 0,8 C b	0,0 ± 0,0 B c
Suspensão concentrada em óleo emulsionável	0		92,8 ± 0,3	
	1 h	91,3 ± 1,3 A a [ns]	88,8 ± 0,6 A a [ns]	87,9 ± 0,8 A a [ns]
	4 h	90,1 ± 0,8 A a [ns]	89,2 ± 0,3 A a [ns]	47,0 ± 10,6 B b
	6 h	89,1 ± 0,6 A a [ns]	86,6 ± 1,3 A a [ns]	22,5 ± 2,8 C b

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada preparação do fungo, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05). [ns] Não apresentam diferença significativa em relação ao tempo zero, segundo comparações individuais por contrastes ortogonais (P<0,05); todas as outras comparação foram significativas em relação ao tempo zero. Coeficiente de variação dos ensaios (EP=2,7%; AF=3,8%; WP=2,7%; SC=9,8%).

A temperatura, principalmente 46ºC, e o tempo de exposição influenciaram a mortalidade ocasionada em lagartas de *D. saccharalis* pelo fungo *M. anisopliae* (Tabela 4). Ocorreu queda significativa da mortalidade ocasionada por Conídios puros de 88,5% para 72,5% após 6h de exposição à 26ºC. Nas demais formas do fungo testadas a viabilidade não foi reduzida nesta

temperatura. Após 6h de exposição à temperatura de 36ºC a formulação Pó molhável teve a eficiência reduzida pela metade, de 42,5% para 22,5%. Estas diferenças não foram detectadas pela análise de interação realizada, e auxiliam a compreender melhor os efeitos destas temperaturas sobre a eficiência do fungo.

Em todas as formas do fungo testadas verificou-se interação significativa entre a temperatura e o tempo de exposição (EP $F_{8, 27}$ = 6,05; P=0,0013; AF $F_{8, 27}$ = 3,58; P=0,0181; WP $F_{8, 27}$ = 11,97; P<0,0001; SC $F_{8, 27}$ = 2,69; P=0,0466). Nesta análise observou-se que na temperatura de 26ºC não ocorreu diferença estatística entre os períodos avaliados para nenhuma das formas do fungo. Em Conídios puros, nos tratamentos incubados sob 36ºC ocorreu diminuição da mortalidade logo após 4h de exposição. Para Arroz+fungo a mortalidade foi reduzida depois de 6h. Nesta mesma temperatura, para o fungo formulado em Pó molhável e em óleo emulsionável não se constataram diferenças entre os tempos avaliados.

À 46ºC para Conídios puros e Pó molhável foi observada redução significativa da porcentagem de mortalidade após os períodos de 4h e 6h de exposição. Em Arroz+fungo e em óleo emulsionável só ocorreu redução após o período 6h. Desta forma, foi possível observar a ocorrência de proteção à temperatura também no parâmetro mortalidade, baseando-se nos resultados obtidos à 36ºC e 46ºC. A princípio as formulações Pó molhável e óleo emulsionável apresentaram este efeito, porém no caso do Pó molhável a variação no ensaio pode ter prejudicado a análise, não sendo observada diferença significativa mesmo com valores bastante distintos, indicando erroneamente a ocorrência de proteção. Isto se comprova observando-se os testes de viabilidade, nos quais ocorreu influencia da temperatura já após 4h de exposição.

Igualmente ao observado para *B. bassiana*, mesmo não sendo estatisticamente possível comparar-se a mortalidade entre os ensaios realizados, salienta-se que a formulação em óleo emulsionável de *M. anisopliae* apresentou os maiores valores de mortalidade encontrados nos bioensaios deste fungo. Mesmo após 4h de incubação à 46ºC obtiveram-se valores de 50% de eficiência, e após 6h sob a mesma temperatura estes valores ainda foram de 40%.

Nas análises de correlação entre a viabilidade do fungo em cada preparação e sua respectiva mortalidade causada nos insetos, todas foram significativas segundo índice de Pearson (EP=0,925, P=0,0001; AF=0,844, P=0,0021; WP=0,903, P=0,0003; SC=0,954, P<0,0001), demonstrando que a tendência dos resultados se confirma entre ambos os parâmetros. Entretanto, também se observou aqui que valores baixos de viabilidade podem apresentar índices de

mortalidade consideráveis, demonstrando que não foi possível se estabelecer uma relação proporcional entre a viabilidade e a potência respectiva de um produto.

Tabela 4 - Mortalidade (%) confirmada de lagartas de *Diatraea saccharalis* causada por suspensões de conídios de *Metarhizium anisopliae* que foram incubadas por 1, 4 e 6 horas em diferentes temperaturas

Fungo	**Tempo**	**Mortalidade (%)**		
		26ºC	**36ºC**	**46ºC**
Conídios puros	**0**		88,5 ± 4,9	
	1 h	80,5 ± 7,1 A a ^{ns}	74,5 ± 11,2 A a ^{ns}	52,5 ± 11,6 A a
	4 h	78,5 ± 12,4 A a ^{ns}	46,5 ± 2,4 B b	22,5 ± 7,3 B c
	6 h	72,5 ± 8,0 A a	32,5 ± 2,0 B b	8,5 ± 3,7 B c
Arroz+fungo	**0**		47,5 ± 22,2	
	1 h	45,0 ± 2,9 A a ^{ns}	45,0 ± 2,9 A a ^{ns}	20,0 ± 4,1 A a
	4 h	47,5 ± 11,8 A a ^{ns}	22,5 ± 5,3 AB a	5,0 ± 2,9 AB b
	6 h	45,0 ± 5,0 A a ^{ns}	15,0 ± 2,9 B b	0,0 ± 0,0 B c
Pó molhável	**0**		42,5 ± 2,5	
	1 h	37,5 ± 8,5 A a ^{ns}	35,0 ± 2,9 A a ^{ns}	30,0 ± 4,1 A a ^{ns}
	4 h	32,5 ± 2,5 A a ^{ns}	42,5 ± 4,8 A a ^{ns}	0,0 ± 0,0 B b
	6 h	40,0 ± 10,0 A a ^{ns}	22,5 ± 6,3 A a	0,0 ± 0,0 B b
Suspensão concentrada em óleo emulsionável	**0**		92,0 ± 2,0	
	1 h	88,0 ± 3,7 A a ^{ns}	84,0 ± 5,1 A a ^{ns}	82,0 ± 11,1 A a ^{ns}
	4 h	85,0 ± 5,1 A a ^{ns}	94,0 ± 2,5 A a ^{ns}	50,0 ± 13,0 AB b
	6 h	74,0 ± 5,1 A ab ^{ns}	85,0 ± 6,8 A a ^{ns}	40,0 ± 9,5 B b

Médias (±EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, em cada preparação do fungo, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey (P<0,05). ^{ns} Não apresentam diferença significativa em relação ao tempo zero, segundo comparações individuais por contrastes ortogonais (P<0,05); todas as outras comparação foram significativas em relação ao tempo zero. Coeficiente de variação dos ensaios (EP=11,2%; AF=13,1%; WP=11,8%; SC=15,6%).

3.3.3 Curva de sobrevivência ao longo do tempo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na forma de conídios puros ou formulados em óleo emulsionável.

Nas equações de regressão obtidas para o efeito da temperatura na viabilidade dos fungos *B. bassiana* (Bb) e *M. anisopliae* (Ma) verificou-se que apenas para *B. bassiana* na formulação SC submetida a 26ºC os dados apresentaram distribuição linear. Nos demais tratamentos os dados apresentaram distribuição cúbica.

As equações que descrevem as porcentagens de germinação a 26ºC, 36ºC e 46ºC para *B. bassiana* na forma de conídios puros foram $y=0{,}015x^3+0{,}271x^2-0{,}821x+90{,}734$ ($R^2=0{,}64$; $F=5{,}31$; P=0,0222), $y=0{,}003x^3-0{,}071x^2+0{,}751x-91{,}623$ ($R^2=0{,}69$; $F=6{,}73$; P=0,0112), e $y=0{,}193x^3-5{,}152x^2+42{,}83x-108{,}32$ ($R^2=0{,}91$; $F=31{,}4$; P<0,0001), respectivamente. Para a formulação SC as equações foram $y=0{,}164x-91{,}514$ ($R^2=0{,}30$; $F=4{,}68$; P=0,0495), $y=0{,}008x^3+0{,}167x^2-0{,}562x+91{,}255$ ($R^2=0{,}86$; $F=18{,}55$; P=0,0003), e $y=0{,}063x^3+0{,}038x^2-16{,}969x-101{,}277$ ($R^2=0{,}97$; $F=106{,}35$; P<0,0001), respectivamente.

Em *M. anisopliae* na forma de conídios puros as equações que descrevem as porcentagens de germinação a 26ºC, 36ºC e 46ºC foram $y=0{,}003x^3+0{,}026x^2+1{,}554x-90{,}115$ ($R^2=0{,}89$; $F=23{,}93$; P=0,0001), $y=0{,}016x^3+0{,}161x^2-1{,}283x-90{,}430$ ($R^2=0{,}79$; $F=11{,}2$; P=0,0022) $y=0{,}138x^3-4{,}14x^2+38{,}49x-107{,}505$ ($R^2=0{,}91$; $F=31{,}23$; P<0,0001), respectivamente, e na formulação SC $y=0{,}016x^3-0{,}419x^2+3{,}415x-95{,}955$ ($R^2=0{,}69$; $F=6{,}83$; P=0,0107) $y=0{,}011x^3-0{,}242x^2+1{,}709x-93{,}454$ ($R^2=0{,}47$; $F=4{,}49$; P=0,0406), $y=0{,}074x^3+0{,}263x^2-15{,}277x-95{,}753$ ($R^2=0{,}96$; $F=81{,}04$; P<0,0001), respectivamente.

Verificou-se que a viabilidade dos conídios das suspensões dos fungos formulados em óleo emulsionável ou não formulados decaiu ao longo do tempo independente mente da temperatura em que foram incubados (Figura 1). Quanto mais elevada a temperatura, maior foi o efeito na redução da sobrevivência destes fungos. A formulação em óleo demonstrou proteção aos conídios, diminuindo os efeitos negativos da temperatura.

Para *B. bassiana* esta proteção não foi tão evidente a 26ºC e 36ºC durante as 12h de avaliação. À 46ºC após 2h de incubação o fungo na forma de EP teve sua viabilidade bastante reduzida, de quase 80% para 30%, chegando à zero após 4h. Quando formulado em óleo, a viabilidade decaiu gradativamente mantendo-se com 20% mesmo após 5h de exposição.

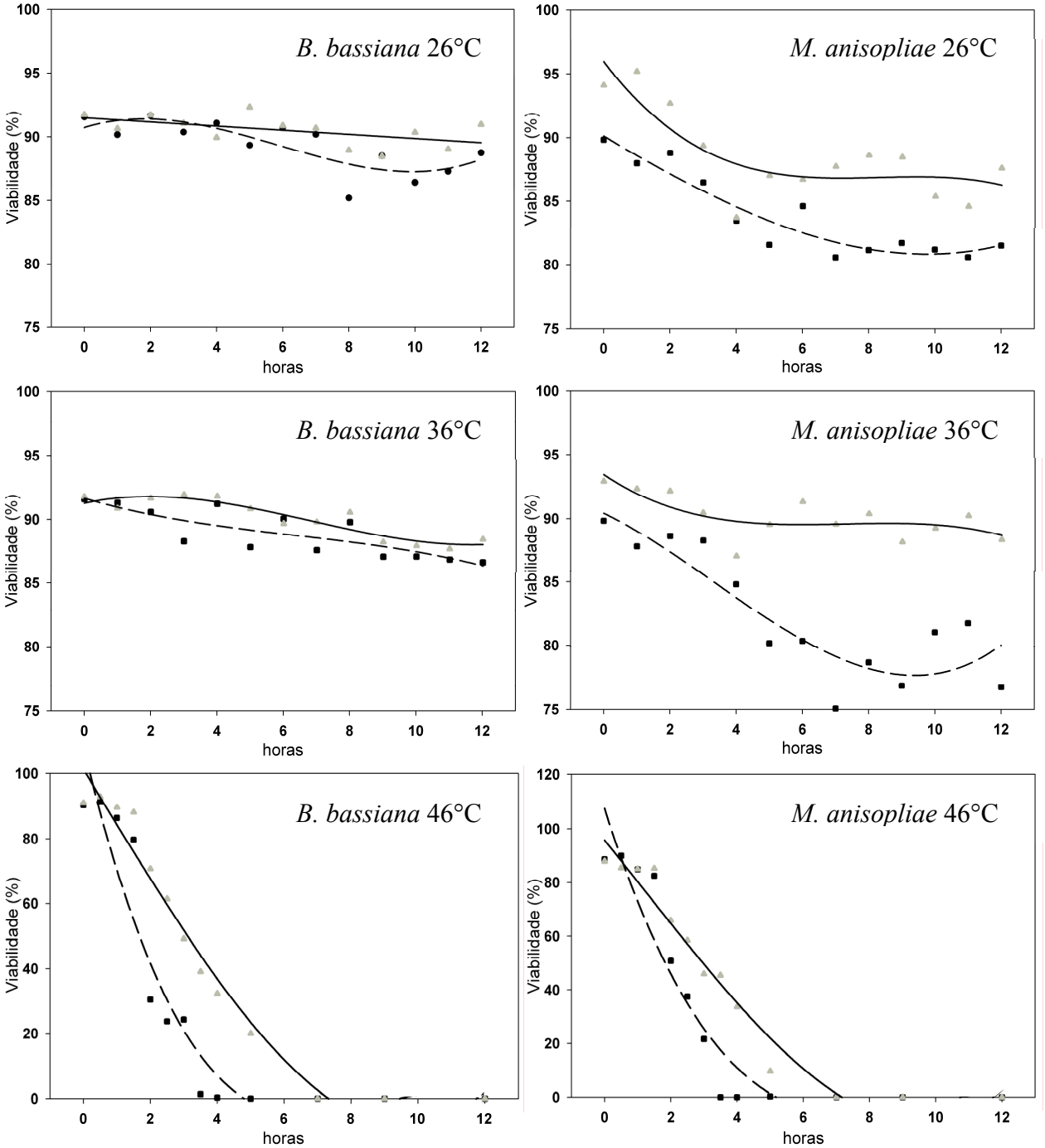

Figura 1 - Viabilidade (%) dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* comparando-se conídios puros (EP = ●; reta - - -) e formulados em óleo emulsionável (SC = ▲; reta ——), incubados a 26º, 36º e 46º C durante 12 horas (26 ± 2ºC e fotofase 14 horas)

Para *M. anisopliae* a proteção oferecida pela formulação em óleo foi observada mesmo nas temperaturas de 26ºC e 36ºC, ocorrendo diferença significativa na viabilidade entre as duas formulações. À 36ºC a viabilidade da suspensão preparada com o produto formulado em óleo foi mantida próxima dos 90% mesmo após 12h de incubação. Na temperatura de 46ºC após 3,5h de exposição, a viabilidade de *M. anisopliae* na forma de EP caiu a zero, enquanto que a da suspensão com o produto formulado em óleo se manteve acima dos 45% neste mesmo período.

3.4 Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que quanto maior o tempo de exposição e maior a temperatura, menor a germinação e conseqüentemente menor a mortalidade ocasionada pelos fungos. Esta tendência já era esperada, visto que muitos trabalhos encontrados na literatura evidenciam os efeitos detrimentais da temperatura sobre parâmetros biológicos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, (por exemplo, DEVI et al., 2005; FERNANDES et al., 2008). Dentre as temperaturas utilizadas neste estudo apenas a de 26ºC encontra-se dentro do limiar ótimo para os fungos testados (ALVES; LECUONA, 1998), sendo que as demais foram avaliadas para simular as possíveis condições encontradas durante as preparações das suspensões em campo. Sob temperaturas elevadas, os conídios são inviabilizados ou podem até apresentar retardo na germinação como verificado por McClathie et al. (1994) e Walstad; Anderson e Stambaugh (1970).

Em alguns casos verificam-se variações na faixa de tolerância, em função, principalmente da espécie, isolado, forma de produção e temperatura de crescimento dos fungos (HARMAN et al., 1991; HYWEL-JONES; GILLESPIE, 1990). A formulação também pode permitir uma maior tolerância do fungo aos efeitos negativos da temperatura, havendo estudos que comprovam este benefício especificamente para a formulação em óleo emulsionável (DAOUST; WARD; ROBERTS, 1983; STARTHERS; MOORE; PRIOR, 1993).

Porém, estes trabalhos demonstram o efeito protetor da formulação em óleo emulsionável para produtos puros, sem que os conídios estejam misturados em água. Assim é possível considerar este ganho em condições de armazenamento, aumentando o tempo de prateleira dos produtos (MOORE et al. 1995). E também, quando estes são liberados no campo na forma de

Ultra-baixo-volume (JENKINS; THOMAS, 1996), na qual os conídios são aplicados diretamente, não ocorrendo o preparo de suspensões em água.

No presente trabalho, o efeito de proteção foi constatado para ambos os fungos na formulação em óleo emulsionável após o preparo da suspensão de aplicação. Este efeito apresenta grande relevância, considerando que esta é uma situação mais próxima das encontradas em campo no momento de pré-aplicação dos fungos. Quando o fungo é misturado em água, independentemente da formulação em que ele se encontra, os conídios que entram em contato com esta água se tornam muito mais sensíveis a ação das condições ambientais adversas, pois iniciam seus processos de desenvolvimento. No caso das formulações oleosas que visam a melhorar a afinidade destes conídios e o espalhamento na superfície do corpo do inseto, a mistura com a água para aplicação é bastante difícil, ocorrendo a formação de pequenas bolhas de óleo (BATEMAN, 1996). Nas formulações em óleo preparadas com conídios muito hidrofóbicos como os de *B. bassiana* e *M. anisopliae* esta mistura se torna ainda mais difícil (PRIOR; JOLLANDS; PATOUREL, 1988).

No entanto, estas bolhas encapsulam os conídios (IBRAHIM et al., 1999), sendo elas possivelmente responsáveis pela maior resistência à ação negativa da temperatura da suspensão de aplicação. O mecanismo deste processo de proteção não foi esclarecido, entretanto acredita-se que o fato dos conídios ficarem envoltos por esta camada de óleo promove certo isolamento, ocorrendo a formação de um microclima favorável que protege e permite posteriormente a melhor germinação dos conídios (BROOKS et al 2004; LUZ; BATAGIN, 2005). Da mesma forma, não se sabe precisamente os modos de ação da temperatura na inviabilização dos conídios, sendo possível somente levantar-se algumas questões.

Durante a produção os fungos passam pelo processo de secagem para posterior extração e formulação dos produtos. A secagem é realizada para facilitar a retirada dos conídios do substrato de produção, e além disso confere muitas características para os fungos como por exemplo uma maior termo-tolerância (McCLATHIE et al., 1994).

Estudos realizados por Faria; Hajek e Wraight (2009) demonstraram que conídios aéreos dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sofrem danos de embebição, prejudicando sua germinação. Estes danos ocorrem pela acelerada hidratação, pois quando organismos secos são imersos em água, a embebição rápida pode causar graves danos à membrana plasmática, ocasionando a morte do organismo (HOEKSTRA et al., 1999). Faria; Hajek e Wraight (2009)

demonstraram também que a temperatura da água tem forte influência na embebição, e que uma formulação a base de óleo mineral não emulsionável apresentou proteção a estes efeitos. Por este motivo, no presente estudo as suspensões foram preparadas utilizando-se solução de Tween 80 (0,05%) padronizada à 22ºC, para evitar o efeito acima mencionado. Acredita-se que da mesma maneira que a formação de gotas que ocorre com a formulação em óleo emulsionável prevenindo o fungo contra os efeitos negativos da temperatura da suspensão de aplicação, pode haver também indiretamente proteção contra os danos de embebição dos conídios, sendo necessários estudos neste sentido.

Vale salientar que a proteção verificada nas formulações em óleo, possivelmente pode ser ainda melhor, visto que neste trabalho a umidade dos conídios antes da formulação estava em 7%. A umidade inicial interfere diretamente na termo-tolerância que o produto final apresentará. Segundo Hedgecock et al. (1995) a umidade ideal encontra-se normalmente entre 4-5%, e nestes níveis de umidade os conídios do fungo *M. flavoviride* demonstraram maior capacidade de suportar os efeitos da temperatura, apresentando os maiores índices de viabilidade.

Fazendo-se um paralelo, o isolado de *M. anisopliae* avaliado se mostrou mais sensível aos efeitos da temperatura, sendo sua viabilidade e virulência mais afetada que *B. bassiana*, principalmente em Conídios puros, Arroz+fungo e na formulação Pó molhável. Nos resultados da curva de sobrevivência ficou evidente para este fungo a grande diferença entre a viabilidade dos Conídios puros e da formulação em óleo emulsionável ao longo do tempo, em todas as temperaturas. Em outros estudos, os conídios de *M. anisopliae* apresentaram melhor capacidade de suportar índices mais altos ou variações de temperatura que *B. bassiana*, tendo uma amplitude maior de sua faixa ótima de desenvolvimento (ALEXANDRE et al., 2006; HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004; HYWEL-JONES; GILLESPIE, 1990; ISKANDAROV, GUZALOVA; DAVRANOV, 2006). Esta diferença de resultados possivelmente pode estar ligada à variabilidade existente entre isolados e suas capacidades térmicas de desenvolvimento.

Quanto aos resultados obtidos nos bioensaios, foi constatado que os insetos apresentaram-se susceptíveis aos fungos em todas as formas testadas, mesmo com a influência da temperatura sobre os fungos. A mortalidade variou de acordo com a respectiva viabilidade dos conídios, verificando-se altos índices de correlação entre estes dois fatores. O potencial de uso dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o controle de *D. saccharalis* foi comprovado por Oliveira et al. (2008), que em seus estudos, demonstraram que além de efetivos no controle, estes fungos agem

sobre parâmetros biológicos do inseto, podendo-se considerá-los promissores para o uso no manejo de populações da praga. A efetividade de *B. bassiana* para o controle de *D. saccharalis* quando produzido em fermentação líquida (ALVES et al., 2002) e também com conídios aéreos formulados em condições de laboratório e campo já foi documentada (LEGASPI; PROPAWSKI; LEGASPI Jr, 2000; WENZEL; GIOMETTI; ALMEIDA, 2006). Estudos realizados por Marques, E.; Alves e Marques, I. (2000) mostraram que mesmo após 80 meses de armazenamento em freezer, os conídios deste fungo podem apresentar grande capacidade infectiva para o inseto.

Em alguns tratamentos foi verificado que mesmo com baixa viabilidade dos conídios a mortalidade apresentada foi desproporcionalmente maior, se comparada à obtida em outro tratamento com iguais condições. Isto pode ter ocorrido pelas características particulares de cada forma/formulação dos fungos, as quais conferem diferenças na virulência ao inseto (como por exemplo a produção de enzimas, a capacidade de penetração, etc.). Entretanto, ressalta-se que mesmo apenas 1% de conídios viáveis nas suspensões, representa uma concentração de $2{,}5\times10^{6}$ conídios viáveis/mL, ou seja, capazes de desencadear o processo infectivo. De maneira semelhante, James e Jaronsck (2000) mostraram que lotes do fungo *B. bassiana* que possuíam viabilidades de 95% e 50% não apresentaram diferenças significativas nos índices de mortalidade quando testados para *Bemisia argentifolii* Bellows Jr e Perring (Sternorrhyncha: Aleyrodidae).

Ainda quanto à diferença de mortalidade observada entre as formas/formulações testadas, foi possível constatar maiores valores de controle nas formulações em óleo emulsionável para ambos os fungos. Este ganho em desempenho pode ter ocorrido pelo fato do óleo ajudar no processo de infecção, conferindo uma melhor aderência e espalhamento sobre a cutícula lipofílica dos insetos do que as suspensões aquosas de conídios, contribuindo para criar condições favoráveis para a germinação e penetração de um elevado número de conídios (LUZ; BATAGIN, 2005). Trabalhos realizados com outros insetos demonstraram tal efeito para algumas formulações oleosas dos fungos *B. bassiana* (LUZ; BATAGIN, 2005; PRIOR; JOLLANDS; PATOUREL, 1988) e também para *M. anisopliae* e outras espécies deste mesmo gênero (BATEMAN et al., 1993; INYANG et al., 2000; JENKINS; THOMAS, 1996).

Dentre os produtos testados, a formulação em óleo de ambos os fungos foi a mais promissora para o controle de *D. saccharalis*, pois além de oferecer proteção contra a temperatura (mantendo-se igualmente efetiva mesmo após 6h à 36ºC), apresentou os maiores índices de mortalidade dos insetos. A proteção a temperatura deve variar com o tipo de óleo (vegetal e

mineral), sendo necessários novos estudos para se determinar os óleos que oferecem melhor proteção à temperatura nas suspensões de aplicação para os isolados ou espécies de fungos que vêm sendo utilizados em larga escala no Brasil.

Referências

ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology,** Londrina, v. 35, n. 1, p. 75-82, 2006.

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. In: 5th International Symposium on Adjuvants for Agrochemicals, 1998, Memphis. **Proceedings**, Memphis: [s.n.], v. 1, p. 170-175, 1998.

ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos. In: _____ **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-381.

ALVES, S.B.; ROSSI, L.S.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar médium 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.

ALVES, S.B.; HADDAD, M.L.; MORAES, R.C.B.; REYES, A.E.L. 2005. Disponível em: <http://www.lef.esalq.usp.br/cm/index.php>. Acesso em: 7 Jul. 2009.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina:** avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 3, p. 69-110.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano.In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 5, p. 97-170.

BATEMAN, R.P., CAREY, M., MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low relative humidities. **Annals of Applied Biology,** Warwick, v. 122, p. 145-152, 1993.

BATEMAN, R.P. Formulation & application of insect pathogens. **Lubilosa Technical Bulletin**, Ascot, v. 4, p. 1-74, 1996.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae.* **Mycological research**, Cambridge, v. 105, n. 7, p. 874-882, 2001.

BROOKS, A.J.; MURO, M.A.; BURREE, E.; MOORE, D.; TAYLOR, M.A.; WALL, R. Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis*: effects of temperature and formulation. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, p. 1043-1049, 2004.

BUGEME, D.M.; KNAPP, M.; BOGA, H.I.; WANJOYA, A.K.; MANIANIA, N.K. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium* anisopliae and *Beauveria bassiana* to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 167, p. 221-227, 2009.

BUGEME, D.M.; MANIANIA, N.K.; KNAPP, M.; BOGA, H.I. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and Metarhizium anisopliae isolates to Tetranychus evansi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, p. 275-285, 2008.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidial. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 151-160, 1983.

DEVI, U.K.; SRIDEVI, V.; MOHAN, C.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, p. 181-189, 2005.

FARIA, M.R.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 346-354, 2009.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control,** Orlando, v. 43, p. 237-256, 2007.

FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 98, p. 69-78, 2008.

HARMAN, G.E.; JIN, X.; STASZ, T.E.; PERUZZOTTI, G.; LEOPOLD, A.C.; TAYLOR, A.G. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control,** Orlando, v. 1, p. 23-28, 1991.

HEDGECOCK, S.; MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. **Biocontrol Science and Technology,** Oxford, v. 5, p. 371-377, 1995.

HEDIMBI, M.; KAAYA, G.P.; SINGH, S.; CHIMWAMUROMBE, P.M.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, p. 149-156, 2008.

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.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; VAN AELST, A.C.; HEMMINGA, M.A. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 22, p. 1121-1131, 1999.

HONG, T.D.; EDGINGTON, S.; ELLIS, R.H.; MURO, M.A.; MOORE, D. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 89, p. 136-143, 2005.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae.* **Biological Control,** Orlando, v. 31, p. 65-71, 2004.

HUANG, B.F.; FENG, M.G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. **Mycopathologia,** Den Haag, v. 168, p. 145-152, 2009.

HYWEL-JONES, N.L.; GILLESPIE, T. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana.* **Mycological research**, Cambridge, v. 94, n. 3, p. 389-392, 1990.

IBRAHIM, L.; BUTT, T.M.; BECKETT, A.S.; CLARK, S.J. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae.* **Mycological research**, Cambridge, v. 103, n. 7, p. 901-907, 1999.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control,** Orlando, v. 5, p. 581-590, 1995.

INYANG, E.N.; MCCARTNEY, A.H.; OYEJOLA, B.; IBRAHIM, L.; PYE, B.J.; ARCHER, S.A.; BUTT, T.M. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological research**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 653-661, 2000.

ISKANDAROV, U.S.; GUZALOVA, A.G.; DAVRANOV, K.D. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae.* **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 72-76, 2006.

JAMES, R.R.; JARONSKI, S.T. Effect of Low Viability on Infectivity of *Beauveria bassiana* Conidia toward the Silverleaf Whitefly. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 76, p. 227-228, 2000.

JENKIS, N.E.; THOMAS, M.B. Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for Locust and Grasshopper control. **Pesticide Science**, Oxford, v. 46, p. 299-306, 1996.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biological Control,** Orlando, v. 21, p. 230-248, 2001.

LACEY, L.A.; GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21ST century. **Entomophaga**, Paris, v. 40, n. 1, p. 3-27, 1995.

LAZZARINI, G.M.J.; ROCHA, L.F.N.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological research**, Cambridge, v. 110, p. 485–492, 2006.

LEGASPI, J.C.; POPRAWSKI, T.J.; LEGASPI JR, B.C. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against Sugarcane Stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the lower Rio Grande Valley of Texas. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 93, n. 1, p. 54-59, 2000.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans.* **Mycopathologia,** Den Haag, v. 160, p. 51-62, 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, n. 2, p. 303-307, 2000.

McCLATCHIE, G.V.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations **Mycological research**, Cambridge, v. 98, n. 7, p. 749-756, 1994.

MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; PRIOR, C. Long term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 193-199, 1995.

MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology,** Warwick, v. 122, p**.** 605-616, 1993.

MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; LOMER, C.J. Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and interactions with temperature. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 63-76, 1996.

OLIVEIRA, M.A.P.; MARQUES, E.J.; TEIXEIRA, V.W.; BARROS, R.G. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

PERFETTI, D.J.C.; MORENO, P.M.; QUINTERO, M.E.A. Efectos de gradientes térmicos, salinos y pH sobre la germinación in vitro de un aislado nativo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, patógeno para *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*. **Revista Científica FCV-LUZ**, Maracaibo, v. 17, n. 6, p. 627-631, 2007

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the Cocoa Weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 52, p. 66-72, 1988.

RANGEL, D.E.N; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 87, p. 77-83, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**. User's Guide. Versão 9.1.3, Cary, NC, USA. 2002/2003.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 515-521, 2000.

STATHERS, T.E.; MOORE, D.; PRIOR, C. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 62, p. 111-115, 1993.

THOMPSON, S.R.; BRANDENBURG, R.L.; ARENDS, J.J. Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. **Biological Control,** Orlando, v**.** 39, p. 401-407, 2006.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of Muscardine Fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 16, p. 221-226, 1970.

WENZEL, I.M.; GIOMETTI, F.H.C.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 73, n.2, p.259-261, 2006.

WRAIGHT, S.P., JACKSON, M.A., DEKOCK, S.L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. (Ed.). **Fungal biocontrol agents – Progress, problems, and potential.** CAB International, Wallingford, 2001. p. 253-287,

YEO, H.; PELL, J.K.; ALDERSON, P.G.; CLARK, S.J.; PYE, B.J. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, p. 156-165, online: 2003.

ZIMMERMAN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 40, p. 36-40, 1982.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espera-se que os resultados obtidos no presente trabalho tragam uma importante contribuição e que possam servir como base para futuras pesquisas nesta área. O método de avaliação da viabilidade desenvolvido apresenta benefícios e facilidades, e além de poder ser utilizado em trabalhos experimentais, possui aplicação comercial para empresas produtoras de fungos entomopatogênicos em suas análises de rotina de controle de qualidade de produtos puros ou formulados.

A seleção de um novo fungistático disponível no mercado e de fácil aquisição, faz com que não seja necessária a compra do princípio ativo para utilização em análises de viabilidade. Umas das contribuições mais importantes é o desenvolvimento da técnica para avaliação da viabilidade da suspensão de aplicação, que constitui-se como uma ferramenta importante para estudos da influência de fatores bióticos e abióticos na eficiência durante o período de pré-aplicação de fungos entomopatogênicos.

Apesar de no presente trabalho os estudos dos efeitos da temperatura sobre o fungo terem sido realizados com enfoque para o controle de pragas da cana-de-açúcar, os resultados aqui obtidos podem ser extrapolados para outras pragas e culturas, visto que o modo de preparo e aplicação dos fungos é semelhante na maioria dos casos. Mesmo sendo um trabalho realizado somente em laboratório, as informações geradas podem ser aplicadas diretamente para a realidade do campo, pois as condições simuladas no trabalho refletem bem as possíveis situações encontradas no momento de pré-aplicação dos fungos na cultura.

Assim, acredita-se que estas informações possam fornecer subsídios para recomendações mais precisas a serem seguidas para a preparação e aplicação de fungos entomopatogênicos, melhorando a eficácia do controle, e consequentemente aumentando a credibilidade e participação dos micoinseticidas no mercado de cana-de-açúcar.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo