

VIABILIDADE DE *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. REISOLADO DE OVOS, LARVAS E ADULTOS DE *ANTHONOMUS GRANDIS* (BOHEMAN) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) ARTIFICIALMENTE INFECTADO

J.C. Almeida¹, A.C. Albuquerque², E.A. Luna-Alves Lima¹

¹Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Av. Nelson Chaves s/nº, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil. E-mail: cezario@cfg.ufcg.edu.br

RESUMO

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (URM 3447) isolado de *Castnia licus* (Drury) e reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro), artificialmente infectado, foi avaliado sob condições (temperatura: $27 \pm 2^\circ \text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$ e fotofase: 14h). Estimou-se a viabilidade de *B. bassiana* (germinação, crescimento colonial e conidiogênese) em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e virulência ao inseto adulto. Conídios em suspensão aquosa com Tween 80 (0,05%), nas concentrações ($0,62 \times 10^6$; $0,24 \times 10^6$ e $0,43 \times 10^6$ conídios/mL), constituíram os inóculos para os testes de viabilidade e virulência. Determinou-se a taxa de germinação para o fungo reisolado e não reisolado, 18h após a inoculação. Crescimento das colônias e conidiogênese foram estimados nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias. As suspensões de conídios nas concentrações aplicadas causaram mortalidade de 96,7, 83,4 e 91,1% em TL de 5,4, 5,9 e 5,3 dias, respectivamente. Verificou-se que *B. bassiana* (URM-3447), reisolado de ovos, larvas e adultos de *A. grandis*, apresentou elevada viabilidade de germinação, crescimento colonial e conidiogênese em meio BDA, podendo ser produzido e empregado como agente de controle do inseto.

PALAVRAS-CHAVE: *Beauveria bassiana*, controle biológico, viabilidade, *Anthonomus grandis*, algodão.

ABSTRACT

VIABILITY OF *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. REISOLATED FROM EGGS, LARVAE AND ADULTS OF *ANTHONOMUS GRANDIS* (BOHEMAN) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) INFECTED ARTIFICIALLY. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (URM 3447) isolated from *Castnia licus* (Drury) and reisolated from eggs, larvae and adults of *Anthonomus grandis* (boll weevil), infected artificially was evaluated under various conditions (temperature: $27 \pm 2^\circ \text{C}$, HR: $60 \pm 10\%$ and photophase: 14h). Estimation was made of the viability of *B. bassiana* (germination, colonial growth and conidiogenesis) in Potato-Dextrose-Agar (PDA) culture medium and virulence on the adult insect. Conidia in watery suspension with Tween 80 (0.05%), at various concentrations (0.62×10^6 ; 0.24×10^6 and 0.43×10^6 conidia/mL) constituted the inoculum for the viability and virulence tests. Determination was made of the rate of germination to reisolated and no-reisolated fungus, 18h after the inoculation. Growth of the colonies and conidiogenesis were estimated in the intervals of 3, 6, 9, 12 and 15 days. Suspension of the conidia in concentrations caused mortality of 96.7, 83.4 and 91.1% in LT_{50} of 5.4, 5.9 and 5.3 days, respectively. The relative pathogen potency (RPP) indicated that the fungus was more aggressive after reisolation. It was verified that *B. bassiana* (URM-3447), reisolated from eggs, larvae and adults of the *A. grandis*, presented high viability of germination, colonial growth and conidiogenesis in PDA medium and high degree of virulence on the adult insect, being able to be used as an insect control agent.

KEY WORDS: *Beauveria bassiana*, biological control, viability, *Anthonomus grandis*, cotton.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Depto. de Biologia, Entomologia, Recife, PE, Brasil.

INTRODUÇÃO

As pragas do algodão são fatores limitantes para a exploração da cultura, sendo as principais responsáveis pela queda de produção. *Anthonomus grandis* (Boheman), bicudo-do-algodoeiro, compromete 100% da safra, sendo referido como a mais importante praga pelos danos que causa e dificuldade de controle (BURKE *et al.*, 1986; JONES, 2001).

Nos EUA é considerado o inseto mais destrutivo do algodoeiro (KIM & SAPPINGTON, 2004). No Brasil, desde sua introdução em 1983 nos Estados de São Paulo e Paraíba, atualmente por todo o País, o inseto tem contribuído para os impactos econômicos e sociais da cotonicultura (SCATAGLINI *et al.*, 2000).

O uso de agroquímicos constitui a principal forma de controle de *A. grandis* com reflexos no ambiente, persistência de resíduos com influência sobre a bioatividade dos solos, afetando os inimigos naturais e promovendo seleção de insetos resistentes (PERES *et al.*, 2004). O controle biológico com fungos entomopatogênicos, ainda é limitado, pois apenas estudos em laboratório têm sido conduzidos para seleção de isolados patogênicos ao inseto (WRIGHT & CHANDLER, 1991). A busca de alternativas de redução populacional do bicudo-do-algodoeiro com menor impacto ambiental tem sido o alvo das recentes pesquisas.

O fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. de ocorrência cosmopolita, vem sendo testado para o controle biológico de insetos-praga sob condições de laboratório e de campo, podendo colonizar artrópodes de diversas ordens (ATHAYDE *et al.*, 2001; ALVES, *et al.*, 2002; LUZ *et al.*, 2004). Neste sentido, WRIGHT (1993) verificou o efeito de um micoinseticida à base de *B. bassiana* nas condições de campo no controle de adultos do bicudo-do-algodoeiro. O controle do inseto no tratamento pulverizado com o micoinseticida não diferiu do tratamento pulverizado com um produto químico no primeiro ano das aplicações.

DOMINGUES-SILVA (2001) relatou que o bicudo-do-algodoeiro é susceptível ao *B. bassiana*, justificando a necessidade de explorar a variabilidade natural de isolados oriundos do inseto e insetos não-alvos infectados em áreas de cultivo em diferentes regiões geográficas. ALVES *et al.* (2002) atestaram a eficiência desse fungo em meio batata-dextrose-ágar (BDA), sugerindo que a viabilidade e virulência podem ser alteradas após passagem pelo hospedeiro-alvo.

Este trabalho teve por objetivos avaliar a viabilidade de *B. bassiana* reisolado de ovos, larvas e adultos do bicudo-do-algodoeiro infectados artificialmente e determinar o potencial de virulência sobre o inseto adulto, visando a possibilidade de produção e aplicação no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Controle Biológico, do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e de Entomologia e Biologia Molecular de Insetos, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (EMBRAPA/CNPA). A colônia do inseto foi desenvolvida em laboratório em dieta artificial para obtenção de ovos, larvas e adultos, seguindo as recomendações de PARRA (1999) e MONNERAT *et al.* (2002). Em todos os ensaios foi utilizada câmara climatizada *Biological Oxygen Demand* (BOD), em condições de temperatura a $27 \pm 2^\circ$ C, UR: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

A linhagem fúngica *B. bassiana* (URM-3447), originalmente isolada de *Castnialicus* (Drury), em cana-de-açúcar, Pernambuco, Brasil, foi cedida pela Coleção de Cultura da Micoteca (URM) do Departamento de Micologia da UFPE. A suspensão inicial na concentração de 10^8 conídios/mL usada na infecção de ovos, larvas e adultos foi preparada com água destilada autoclavada e espalhante adesivo (Tween 80 a 0,05%), determinada em câmara de Neubauer sob microscópio óptico, conforme o método de quantificação de conídios adotado por ALVES & MORAES (1998a). Essas formas do inseto foram utilizadas no processo de reisolamento de *B. bassiana* (URM-3447). Os cadáveres foram lavados com soluções de hipoclorito de sódio a 2% por 2min, em álcool a 70% por 3min e duas vezes em água destilada autoclavada por 3min, depois foram transferidos para placas de Petri (6,5 x 2,5 cm) forradas com papel-filtro esterilizado e umedecido em água destilada autoclavada e, então, mantidos nessa câmara úmida para confirmação do agente causal, observando-se sob microscópio estereoscópio para confirmação da mortalidade e, ocorrência de conidiogênese sobre ovos, larvas e adultos após 15 de incubação. Depois desse procedimento, as estruturas fúngicas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar mais antibiótico cloranfenicol (2%) (BDA+A). Após 15 dias do crescimento fúngico, transferiu-se desses tubos um inóculo monospórico para 3 tubos de ensaio; e no mesmo período, o fungo foi transferido para placas de Petri contendo BDA. Estas placas, em triplicata, foram incubadas por 15 dias. A partir dessas subculturas, preparou-se uma suspensão de conídios na concentração de 10^8 conídios/mL que viabilizou uma diluição sucessiva, conforme ALVES & MORAES (1998a) e TEFFERA & PRINGLE (2003), conseqüentemente, estimou-se a concentração letal (CL_{50}) utilizada nos estudos de viabilidade (germinação, crescimento colonial e conidiogênese) e na determinação da virulência ao inseto adulto. Após o reisolamento, considerou-se como fungo-padrão (FP) *B. bassiana* (URM-3447) e fungo-teste (FT), *B. bassiana* (URM-3447) reisolado de ovos, larvas e adultos.

A CL_{50} e os Intervalos de Confiança (IC) calculados foram obtidos por análise de Probit e preparada com água destilada autoclavada e Tween-80 (0,05%). A inoculação de *B. bassiana* (padrão e teste) foi feita através de 3 bioensaios de seis tratamentos e 4 repetições de 60 insetos adultos com idade de quatro dias de emergência, homogêneos e sadios. A distribuição experimental consistiu em delineamento inteiramente casualizado. Os insetos foram submersos em cada CL_{50} por 2 ciclos de 3seg, conforme procedimento adotado por DOMINGUES-SILVA (2001). Após os tratamentos, foram transferidos para gaiolas de polipropileno (10 x 10 x 10 cm), teladas com tecido *voile*; e alimentados com 3 tabletes de 2 cm³ de dieta artificial sobrepostos a discos de papel-alumínio. A mortalidade confirmada, ajustada conforme ABBOTT (1925), foi aferida diariamente até o 10^o dia após os tratamentos, determinando-se o tempo letal (TL_{50}). A potência relativa do patógeno (PRP), em unidade padrão (UP), foi estimada a partir dos dados do TL_{50} para a mortalidade do inseto adulto em cada tratamento. O cálculo da PRP, correspondente a 1000x o coeficiente do TL_{50} do fungo-padrão sobre o fungo-teste, foi determinado conforme ALVES & PEREIRA (1998b).

A viabilidade do patógeno foi avaliada, determinando-se o percentual de germinação dos conídios, crescimento da colônia e conidiogênese em BDA. Para se estimar a viabilidade da germinação dos conídios, 100 μ L de cada CL_{50} foi espalhada com uma alça de *Drigalsky* sobre a superfície do meio de cultura em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em triplicata, incubadas em câmara (BOD). O percentual de germinação foi aferido 18h depois da inoculação, contando-se 500 conídios germinados e não germinados, de acordo com o método adotado por ALBUQUERQUE *et al.* (2005), em faixas que corresponderam aos diâmetros vertical e horizontal do campo de leitura de 1mm sob microscópio ótico (400x).

O crescimento colonial foi mensurado com o auxílio de um paquímetro a partir de inóculos (discos de 5 mm de diâmetro), obtidos das subculturas. Esses discos foram transferidos para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA, em triplicata. As leituras do crescimento radial foram feitas em milímetros nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação.

Na determinação da conidiogênese, 100 μ L de cada CL_{50} foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de suspensão aquosa com Tween-80 (0,05%). Essa suspensão foi agitada por 5min em *vortex* (400 rpm), em seguida, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* foi transferida uma alíquota de 100 μ L para uma câmara de *Neubauer*, onde se procedeu a quantificação dos conídios em cada intervalo (3, 6, 9, 12 e 15 dias) de incubação.

Em cada parâmetro estudado, obteve-se análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (FINNEY, 1971). Os cálculos de CL_{50} foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o programa software Polo-PC, conforme interpretações de THRONE (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação de conídios

Conídios de *B. bassiana* (URM 3447), germinados em BDA, apresentaram forma globosa, em média, de 2,2 a 2,5 μ m, tubo germinativo de tamanho maior que um terço do conídio não germinado. Essas dimensões estão de acordo com SAMSON (1981) ao observar que as espécies de *Beauveria* encontradas freqüentemente sobre os insetos, apresentam células conidiogênicas dilatadas na parte basal, de inserção terminal em ziguzague bem definido, conídios globosos ou subglobosos de 2 a 3 x 2 a 2,5 μ m em conidióforos, formando densos cachos. As estruturas de desenvolvimento de *B. bassiana* (URM-3447) apresentaram-se conforme as descrições de ALVES *et al.* (2002) sobre *B. bassiana*447 (ATCC 20872), observando os ciclos de crescimento (germinação, tubo germinativo, formação de hifas, diferenciação micelial, conidióforos e conidiogênese).

Verificou-se elevada taxa de germinação 18h após a inoculação, com percentuais variando de 92,6, 93,4 e 91,0% no fungo-teste e de 91,1, 89,4 e 90,0% no fungo-padrão para ovos, larvas e adultos, respectivamente (Tabela 1).

Esses dados aproximaram-se dos obtidos por MARQUES *et al.* (2000) ao observarem a viabilidade de *B. bassiana* isolado de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) apresentando 100% de germinação depois de 80 meses de armazenamento em umidade (15,5%) e temperatura ($-7 \pm 1^{\circ}$ C). Estudos de viabilidade, envolvendo a germinação de conídios, têm sido relacionados com o processo infeccioso e virulência dos fungos entomopatogênicos, visando a seleção de isolados que apresentem diferenças quanto a estes aspectos.

A ausência de correlação entre a mortalidade de insetos e a taxa de germinação dos conídios de *B. bassiana* tem sido observada por diversos pesquisadores (LECUONA *et al.*, 1996; FARIA *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2002; DEVI *et al.*, 2005). SILVA *et al.* (2003) avaliaram a viabilidade de germinação de seis isolados de *B. bassiana* em meio BDA+A (antibiótico quemeticina), em placas de Petri, a $26 \pm 1^{\circ}$ C e fotofase de 12h. Depois de 12 dias de incubação, esses conídios foram empregados contra larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), causando mortalidade de 70 e 96%, na concentração de 10^8 conídios/mL, 8 dias após os tratamentos.

Tabela 1 - Geminação de conídios de *Beauveria bassiana* (URM-3447), em meio BDA, reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* infectados artificialmente, 18 horas após a incubação (média ± EP - erro padrão). Temp.: 27 ± 2° C, UR: 60 ± 10% e fotofase: 14h.

<i>B. bassiana</i>	Estágio do inseto/Germinação de Conídios (%)		
	Ovo	Larva	Adulto
FT ¹	92,6 ± 1,45 A a	93,4 ± 2,02 A a	91,0 ± 2,56 A a
FP ²	91,1 ± 2,09 A a	89,4 ± 3,94 B a	90,0 ± 1,95 A a
C V	3,05	2,47	3,04

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹Fungo-Teste (reisolado de ovos, larvas e adultos, respectivamente).

²Fungo-Padrão (não reisolado).

Tabela 2 - Crescimento de colônias de *Beauveria bassiana* (URM-3447), em meio BDA, reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* infectados artificialmente, em intervalos de 3 a 15 dias (média ± EP - erro padrão). Temp.: 27 ± 2° C, UR: 60 ± 10% e fotofase: 14h.

Intervalo (dias)	<i>Beauveria bassiana</i> /Diâmetro das colônias (mm)			
	FT ¹	FT ²	FT ³	FP*
0 - 3	13,3 ± 1,76 D a	11,6 ± 2,23 D a	15,0 ± 3,22 D a	14,6 ± 2,87 C a
3 - 6	27,3 ± 1,23 C D a	25,6 ± 1,34 C a	28,6 ± 2,11 C a	29,6 ± 1,23 B C a
6 - 9	43,1 ± 2,02 B C a	34,0 ± 2,87 C a	43,3 ± 0,95 B a	41,3 ± 2,34 A B a
9 - 12	46,0 ± 2,08 A B a	47,6 ± 2,45 B a	50,0 ± 1,93 A B a	48,0 ± 3,87 A a
12 - 15	62,3 ± 1,32 A a	61,0 ± 4,14 A a	62,6 ± 1,65 A a	55,0 ± 1,67 A a
C V	16,18	11,25	12,37	15,18

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^{1, 2, 3} Fungo-Teste (reisolado de ovos, larvas e adultos, respectivamente).

* Fungo-Padrão (não reisolado).

Esses estudos confirmam a facilidade de cultivo e viabilidade deste patógeno em meios artificiais, em diferentes condições de armazenamento, justificando, também, a importância desses parâmetros biológicos para *B. bassiana* (URM 3447) sobre o bicudo-do-algodoeiro.

Crescimento das colônias

As colônias de *B. bassiana* (URM-3447) apresentaram aspectos morfológicos e citológicos compatíveis com as descrições de LUNA-ALVES LIMA & TIGANO (1989), quando estudaram a fase leveduriforme desse fungo, encontrando variação nas estruturas celulares em BDA e sobre a hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) 36h após a inoculação. Esses autores descreveram estruturas nucleares cilíndricas (1-7 núcleos).

A taxa de crescimento radial das colônias de *B. bassiana* (URM-3447) não registrou diferença signifi-

cativa aos 15 dias de crescimento, em meio BDA, cujas dimensões atingiram: 62,3, 61,0, 62,6 e 55,0 mm para o reisolado de ovos, larvas, adultos e o controle, respectivamente (Tabela 2).

ALVES *et al.* (2002) estudaram o comportamento de crescimento de colônias de 15 isolados de *B. bassiana* em diferentes meios de cultura, como batata-dextrose-ágar (BDA), MacConkey-ágar + cristal violeta (BBL), sabouraud-dextrose-ágar (DAS) adicionados de cloreto de sódio (NaCl) em 0,25, 0,5, 1,2 e 3%. Para esses autores as colônias formaram-se distintamente entre 80 e 96h, a partir de 120h apresentaram aspecto mucoide, com estrutura micelial uniformemente distribuída sobre a superfície de ambos os meios, em placa de Petri. Esses estudos demonstraram uma relação direta de crescimento do fungo com o substrato utilizado. Todavia, para produção em massa e formulação do patógeno *B. bassiana* (URM-3447) para o emprego no campo deve ser adotado um meio de cultivo de fácil manuseio e de baixo custo.

Tabela 3 - Conidiogênese de *Beauveria bassiana* (URM-3447), em meio BDA, reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* infectados artificialmente, em intervalos de 3 a 15 dias. Temp.: $27 \pm 2^\circ \text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$ e fotofase: 14h.

<i>Beauveria bassiana</i>	Intervalo (dias)/Conidiogênese (10^7 conídios/mL)				
	3	6	9	12	15
FT ¹	0,03 A b	0,2508 A b	0,8432 A b	1,8604 A a	2,1344 A a
FT ²	0,0444 A c	0,3498 A b c	0,67 A b c	2,0696 A b	2,6262 A a
FT ³	0,0486 A c	0,354 A c	1,23 A b c	2,8484 A b	3,1546 B a
FP*	0,0476 A c	0,2508 A c	1,152 A b c	1,7848 A a b	2,0344 A a
C V	3,95	6,05	3,03	3,46	2,96

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^{1, 2, 3} Fungo-Teste (reisolado de ovos, larvas e adultos, respectivamente).

* Fungo-Padrão (não reisolado).

Tabela 4 - Virulência de *B. bassiana* ($CL_{50} \pm IC_{0,05}$) reisolado de ovos, larvas e adultos de *A. grandis* a partir da média de mortalidade ($\pm EP$) sobre a fase adulta do inseto. TL_{50} : Tempo Letal. PRP: Potência Relativa do Patógeno.

$CL_{50} \pm IC$ (Conídios/mL)	Mortalidade (%)	TL_{50} (dia)		PRP (UP) Fungo-Teste
		(Fungo-Teste)	(Fungo-Padrão)	
($0,62 \times 10^6$ A) ⁽¹⁾	$96,7 \pm 2,72$ A	5,4 B	-	1.259,25 A
($0,12 \times 10^4$; $6,18 \times 10^6$)				
($0,24 \times 10^6$ A) ⁽²⁾	$83,4 \pm 1,43$ B	5,9 A	-	1.084,74 B
($4,32 \times 10^4$; $6,21 \times 10^6$)				
($0,43 \times 10^6$ A) ⁽³⁾	$91,1 \pm 2,10$ A	5,3 B	-	1.245,28 A
($2,75 \times 10^4$; $6,92 \times 10^7$)				
Controle ⁽⁻¹⁾	$91,0 \pm 1,03$ A	-	6,8 A	-
Controle ⁽⁻²⁾	$77,1 \pm 1,12$ C	-	6,4 A	-
Controle ⁽⁻³⁾	$89,1 \pm 0,19$ A	-	6,6 A	-

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

^(1,2,3) CL_{50} de *B. bassiana* reisolado de ovos, larvas e adultos, respectivamente.

^(-1,-2,-3) CL_{50} de *B. bassiana* (padrão) não reisolado de ovos, larvas e adultos, respectivamente.

Conidiogênese

O desenvolvimento de *B. bassiana* (padrão e teste) sobre o inseto adulto coincidiu com as observações de DOMINGUES-SILVA (2001) com *B. bassiana* (CG 138); iniciando-se entre as articulações do fêmur e da tibia, membrana cervical, suturas cranianas e probóide e posteriormente colonizando todo o corpo do inseto. Ovos e larvas ficaram completamente cobertos pelas estruturas celulares (micélio) e distinta conidiogênese esbranquiçada.

O fungo-teste apresentou elevada produção de conídios em todos os intervalos de tempo: 3, 6, 9, 12 e 15 dias, diferindo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A maior conidiogênese em BDA foi observada aos 15 dias para o fungo reisolado da fase adulta. O FT, reisolado de ovos, larvas e adultos, demonstrou uma significativa conidiogênese de $2,1344 \times 10^7$; $2,6262 \times 10^7$ e $3,1546 \times 10^7$ conídios/mL, respectiva-

mente. FP produziu $2,0344 \times 10^7$ conídios/mL (Tabela 3). Esses dados sugeriram, também, uma correlação positiva para a produção de conídios em relação aos intervalos de tempo, considerando as diferentes vias de reisolamento.

Avaliação de conidiogênese de *B. bassiana* sobre insetos mortos incubados a 25°C foram conduzidos por LUZ & FARGES (1998). Esses autores já concluíram que houve significativo declínio da viabilidade dos conídios entre 28 e 30°C e inexpressiva conidiogênese a 35°C . VANDEBERG *et al.* (1998) avaliaram a capacidade de *B. bassiana* sob condições de 20 e 30°C , causando mortalidade de lagartas de *P. xylostella*, variando de 72 a 100% .

A produção de conídios viáveis em meios artificiais e sobre o cadáver do inseto constitui importante parâmetro quanto à avaliação potencial desse patógeno. Estudos têm sido realizados em laboratório e no campo visando indicar linhagens mais virulen-

tas ao inseto-alvo (DOMINGUES-SILVA, 2001). Nesse sentido, TEFFERA & PRINGLE (2003) estudaram a produção de conídios de *B. bassiana* (BB-01) sobre cadáveres de larvas *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae), concluindo que a viabilidade foi influenciada pela variação de temperatura (15, 20, 27 e 30° C), umidade relativa, concentração de conídios e métodos de exposição. Os maiores percentuais de esporulação (80%) foram observados na faixa de 20 a 27° C. Esses parâmetros devem ser considerados na formulação e aplicação de *B. bassiana* (URM-3447) em programa de controle de *A. grandis*.

Virulência

As CL_{50} de $0,62 \times 10^6$; IC = $0,12 \times 10^4$ a $6,18 \times 10^6$ conídios/mL, para ovo; $0,24 \times 10^6$; IC = $4,32 \times 10^4$ a $6,21 \times 10^6$ conídios/mL, para larva e $0,43 \times 10^6$; IC = $2,75 \times 10^4$ a $6,92 \times 10^7$ conídios/mL, para adulto empregadas no tratamento do inseto adulto, ocasionou mortalidade diferenciada comparada à via de reisolamento do patógeno. A mortalidade confirmada do inseto na CL_{50} do FT reisolado de ovos, larvas e adultos foi de 96,7, 83,4 e 91,1%, respectivamente (Tabela 4). Todavia, os valores preditos pela análise diminuíram à medida que o intervalo de tempo entre a inoculação e a avaliação aumentou entre as diferentes fases do inseto, enquanto o efeito da mortalidade foi dependente da via de reisolamento do patógeno.

O TL_{50} e a potência relativa do patógeno (PRP) se correlacionaram positivamente com a CL_{50} e com os valores da mortalidade. Verificou-se que o FT reisolado de ovos foi o mais virulento para o inseto adulto, apresentando um TL_{50} de 5,4 dias, evidenciando que para esse caso o valor do TL_{50} foi menor quando a mortalidade foi mais elevada. Já para o FT reisolado de larvas observou-se um TL_{50} de 5,9 dias e o FT reisolado de adultos apresentou TL_{50} de 5,3 dias. O TL_{50} do fungo-padrão foi 6,8, 6,4 e 6,6 dias. A PRP calculada para o FT, reisolado de ovos foi de 1.259,25UP, de larvas 1.084,74UP e de adultos 1.245,28UP, expressando-se mais elevada para os reisolados de ovos e adultos (Tabela 4). Esses dados sugerem maior especificidade e virulência da linhagem fúngica após passagem pelo inseto-alvo nas fases de ovo e adulto, parâmetro biológico de grande importância que deve ser considerado na adoção desta via de obtenção de inóculos para uso em programa de produção do fungo para o controle da praga. Para SILVA *et al.* (2003), o TL_{50} deve ser utilizado como um parâmetro complementar na determinação da virulência, considerando que é mais importante a efetiva redução populacional da praga do que a rapidez com isso se processa, justificando que, os agentes fúngicos, por serem mais lentos na infecção e colonização do hospedeiro, não têm, necessariamente, que

possuir ação letal rápida sobre insetos não transmissores de doenças.

A manutenção da viabilidade do patógeno é importante no controle microbiano, devendo-se manuseá-lo adequadamente para manter sua virulência ou melhorá-la através de métodos genéticos, físicos, químicos ou processos biológicos, dentre esses, recomenda-se a alternativa da passagem sucessiva em insetos alvo (ALVES & PEREIRA, 1998b; AZEVEDO, 1998; SERAFINI *et al.*, 2001). O emprego desses estudos com o bicudo-do-algodoeiro têm sido limitados, provavelmente dada a dificuldade de sua obtenção e manutenção em criações massais em dieta artificial ou natural, sendo nas fases de ovo e larva inexistentes.

LEITE *et al.* (2003), advertiram que as repicagens sucessivas podem induzir a perda de viabilidade de germinação e infectiva. *B. bassiana* está sujeito a estes efeitos, podendo perder a virulência devido a transferência sucessiva em meios de cultura artificiais. Todavia, evidenciou-se que a linhagem de *B. bassiana* (URM-3447) testada neste estudo comportou-se, em laboratório, de maneira peculiar sobre o bicudo-do-algodoeiro, demonstrando viabilidade e alto grau de virulência ao inseto adulto, antes e depois do reisolamento.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que *B. bassiana* (URM-3447) possui elevado potencial de controle sobre *A. grandis*, parâmetro que recomenda o seu emprego em programa de controle da praga, considerando os meios de produção *in vitro*, fatores ambientais e métodos de exposição no campo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor. Às instituições Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelas facilidades de acesso aos Laboratórios de Pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.18, n.3, p.265-267, 1925.
- ALBUQUERQUE, A.C.; PEREIRA, K.C.A.; CUNHA, F.M.; VEIGA, A.F.S.L.; ATHAYDE, A.C.R.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotropical Entomology*, v.34, n.4, p.585-591, 2005.

- ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Org.). *Controle microbiano de insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a, v.1, p.765-777.
- ALVES, S.B. & PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Org.). *Controle microbiano de insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b, v.1, p. 845-870.
- ALVES, S. B.; ROSSI, L. S.; LOPES, R. B.; TAMAI, M. A.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana* yeast phase on Agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.81, n.4, p.70-77, 2002.
- AZEVEDO, J. L. *Genética de microrganismos*. Goiânia: UFG, 1998, 490p.
- ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA, U.L.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Fungos Entomopatogênicos: uma alternativa para o controle do carrapato bovino - *Boophilus microplus*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.21, n.1, p.12-15, 2001.
- BURKE, H.R.; CLARK, W.; CATE, E.; FRYXELL, J.R. Origin and dispersal of the boll weevil in america. *Entomological Society of America*, v.32, n.3, p.228-238, 1986.
- FINNEY, D.J. *Probit analysis*. England: Cambridge University Press, 1971. 356p.
- DEVI, K.U.; SRIDEVI, V.; MURALI-MOHAN, C.H.; 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*, v.88, n.1, p.181-189, 2005.
- DOMINGUES-SILVA, C.A. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.2, p.243-247, 2001.
- FARIA, M.R.; MARTINS, I.; MELLO, R.; TIGANO, M.S. Entomopathogenic Fungal (Hyphomycetes) collection: assessment of conidial viability. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, n.8, p.1497-1503, 1999.
- JONES, R.W. Evolution of the Host Plant Associations of the *Anthonomus grandis* Species Group (Coleoptera: Curculionidae): Phylogenetic Tests of Various Hypotheses. *Annals of the Entomological Society America*, v.94, n.1, p.51-58, 2001.
- KIM, K.S. & SAPPINGTON, T.W. Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, v.13, n.2, p.293-303, 2004.
- LECUONA, R.E.; MILANI, M.S.; DIAS, B.M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, n.2, p.299-307, 1996.
- LEITE, L.G.; BATISTA-FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2003. 92p.
- LUNA-ALVES LIMA, E.A.; TIGANO, M.S. Cytology of the yeast-like structures of *Beauveria bassiana* in liquid media and in the hemolymph of *Spodoptera frugiperda*. *Revista de Microbiologia*, v.20, n.4, p.85-94, 1989.
- LUZ, C. & FARGES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.72, n.2, p.97-103, 1998.
- LUZ, C.; ROCHA, L.F.N.; NERY, G.V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic Triatomine-infested areas in central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*, v.33, n.6, p.783-791, 2004.
- MARQUES, E.J.; ALVES, S.B.; MARQUES, I.M.R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. A *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.29, n.4, p.300-307, 2000.
- MONNERAT, R.G.; NÖBRE, S.D.N.; NETO, O.B.O.; SCHMIDT, F.G.V.; DIAS, S.; LAUMAN, R.; SA, M.F.G.; SUIJI, E.R. Parâmetros bionômicos do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, v.1, n.29, p.1-20, 2002.
- PARRA, J.R.P. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137p.
- PERES, T.B.; ANDRÉA, M.M.; LUCHINI, L.C. Agrotóxicos usados na cultura do algodão: efeito na atividade das enzimas desidrogenase e arilsulfatase do solo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.71, n.3, p.363-369, 2004. Disponível em: <http://biologico.sp.gov.br/arquivos/v71_3/peres.pdf>. Acesso em: 2005.
- SAMSON, R.A. Identification of entomopathogenic deuteromycetes. In: BURGESS, H.D. (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London: Academic Press, 1981. p.93-106.
- SCATAGLINI, M.A.; CONFALONIERI, V.A.; LANTERI, A.A. Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of RAPD analysis. *Genetica*, v.108, v.1, p.127-136, 2000.
- SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. In: AZEVEDO, J.L. (Ed.). *O uso dos fungos na biotecnologia*. Guaíba: Agropecuária, 2001. p.93-152
- SILVA, V.C.A.; BARROS, R.; MARQUES, E.J.; TORRES, J.B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotropical Entomology*, v.32, n.4, p.653-658, 2003.
- TEFERA, T. & PRINGLE, K.L. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.84, n.8, p.90-95, 2003.
- THRONE, J.E.; WEAVER, D.K.; CHEW, V.; BAKER, J.E. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology*, v.88, n.3, p.1510-1512, 1995.
- VANDEBERG, J.D.; RAMOS, M.; ALTRE, J.A. Dose-response and age and temperature related susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes):

Moniliacea). *Environmental Entomology*, v.27, n.4, p.1017-1021, 1998.

WRIGHT, J.E. Control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) with Naturalis-L: a mycoinsecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.86, n.3, p.1355-1358, 1993.

WRIGHT, J.E.; CHANDLER, L.D. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against

the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, n.4, p.448-449, 1991.

Recebido em 9/11/05

Aceito em 29/12/05