

PRODUÇÃO SEMISSÓLIDA DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* E *BEAUVERIA BASSIANA* EM DIFERENTES SUBSTRATOS E EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E DA TEMPERATURA SOBRE PROPÁGULOS DESSES ENTOMOPATÓGENOS

E.L. Ottati-de-Lima^{1,2}, A. Batista Filho¹, J.E.M. Almeida¹,
M.H. Gassen¹, I.M. Wenzel¹, A.M.B. de Almeida¹, L.O. Zapellini¹

¹Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Rod. Heitor Penteado, km 3, CEP 13092-543, Campinas, SP, Brasil. E-mail: batistaf@biologico.sp.gov.br

RESUMO

O trabalho teve os seguintes objetivos: 1) avaliar diferentes substratos para a produção semissólida dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*; 2) verificar a tolerância dos conídios produzidos ao efeito da radiação ultravioleta e da temperatura; e 3) avaliar a patogenicidade dos conídios a *Diatraea saccharalis*. Para ambos os fungos, foram utilizadas 6 repetições para cada tratamento: amido de milho, arroz integral, arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 e 2, aveia em flocos, canjiquinha, farelo de trigo, farinhas de mandioca crua, de milho amarela e de trigo especial, fubá, milho em grãos, polvilho azedo, soja em grãos, trigo moído e turfa. Os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer e a determinação da viabilidade foi realizada através da observação em microscópio, dos conídios germinados e não germinados, após espalhamento da suspensão fúngica em placas de Petri contendo BDA. No ensaio com radiação os fungos foram expostos à radiação por 25 e 50 segundos e foi considerado um tratamento sem exposição; para temperatura os fungos foram expostos a 20, 25, 30 e 35°C. Utilizando a torre de Potter, 2 mL de cada suspensão fúngica dos tratamentos foram pulverizados em lagartas de *D. saccharalis*. As maiores concentrações de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram encontradas nos tratamentos com arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 e 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído e a viabilidade dos conídios produzidos superou os 94%. Quanto maior o tempo de exposição à radiação menor foi o número de conídios viáveis; também ocorreu perda significativa da viabilidade dos conídios quando expostos à temperatura de 35°C. Os fungos foram patogênicos para *D. saccharalis*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle microbiano, fungos entomopatogênicos, bioinseticidas, *Insecta*, meios de cultura.

ABSTRACT

SEMI-SOLID PRODUCTION OF *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROK AND *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL ON DIFFERENT MEDIA AND THE EFFECTS OF ULTRAVIOLET RADIATION AND TEMPERATURE ON THE INFECTIVE PROPAGULES OF THESE FUNGI. The present study was aimed to evaluate different (semi-solid) media for the production of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* propagules, and to evaluate the tolerance of these propagules to ultraviolet radiation and temperature. The experiments were performed at the Biological Control Laboratory of the Instituto Biológico at Campinas, São Paulo, Brazil. For both fungi, 6 repetitions were performed for each of the 17 treatments: corn starch, full rice, parboiled rice, type-1 rice, type-2 rice, oat flakes, canjiquinha [grits], wheat flour, raw cassava flour, yellow corn flour, special wheat flour, corn flour, corn in grains, cassava starch, soy in grains, crushed wheat, and turf. The viability analysis was done in plastic plates containing BDA. For the bioassays involving exposure to ultraviolet light and temperature, BDA was also used for viability analysis, and each treatment was exposed to the UV radiation for 0, 25 and 50 seconds, the temperature exposure being at 20, 25, 30 and 35°C. Using a Potter tower, 2 mL of fungus suspension from each treatment was inoculated to the *Diatraea saccharalis* caterpillars. Regarding the sporulation, the largest concentrations of *M. anisopliae* and *B. bassiana* were found for the treatments with parboiled rice, type-1 rice, type-2 rice, yellow corn flour, corn flour and crushed wheat. The viability of all treatments was superior to 94.00%. Also, the longer the duration of the exposition to the UV, the

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP, Brasil.

smaller the number of fertile conidia. At 35°C, a significant loss of conidia viability was observed, and all the treatments presented some level of virulence.

KEY WORDS: Microbial control, entomopathogenic fungi, bioinsecticide, Insecta, culture media.

INTRODUÇÃO

Apesar dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* serem conhecidos devido à patogenicidade que apresentam para um grande número de insetos, nas condições naturais, muitos problemas ocorrem quando a produção dos fungos é realizada em escala industrial e a sua aplicação é efetuada em grandes áreas. Assim, alguns problemas necessitam ser estudados como: caracterização, padronização de linhagens, métodos de produção massal de conídios, formulações, manutenção de linhagens agressivas, métodos de aplicação, compatibilidade do fungo com inseticidas, controle associado e, principalmente, os fatores que regulam epizootias nas condições de campo (ALVES, 1998).

Os entomopatógenos são muito sensíveis aos fatores bióticos e abióticos, que influenciam na sobrevivência, propagação e na infecção do hospedeiro (GOETEL *et al.*, 2000). Entre os abióticos, a radiação solar ultravioleta (UV) é a mais importante (FARGUES *et al.*, 1996), pois pode inativar os conídios, provocar danos letais ao DNA e mutações (NICHOLSON *et al.*, 2000). A viabilidade e atividade biológica dos fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pela temperatura, umidade, substrato, radiação ultravioleta e outros fatores (BATISTA FILHO; CARDELLI, 1986).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar diferentes substratos na produção semissólida dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, bem como o efeito dos meios na suscetibilidade dos conídios à radiação

ultravioleta e diferentes temperaturas e também na patogenicidade dos fungos às lagartas da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, localizado em Campinas, SP. Os isolados IBCB 425 de *M. anisopliae* e IBCB 66 de *B. bassiana* estão depositados na Coleção de Micro-organismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim de Abreu" do mesmo laboratório, onde os conídios puros se encontram armazenados dentro de "ependorfs" em freezer a -12°C.

Isolados utilizados: Para a realização dos ensaios, os isolados foram repicados por meio de 3 pontos equidistantes em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) e foram incubados em câmara para germinação (BOD), durante 10 dias na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 1\%$ e fotofase de 12 horas.

Produção dos fungos, efeito da radiação UV e temperatura: Foram preparados 17 tratamentos: amido de milho, arroz integral tipo 1, arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, aveia em flocos, canjiquinha, farelo de trigo, farinha de mandioca crua, farinha de milho amarela, farinha de trigo especial, fubá, milho em grãos, polvilho azedo, soja em grãos, trigo moído e turfa.

Tabela 1 - Quantidades de substrato e água destilada utilizada para o preparo dos meios naturais semissólidos.

Substrato	Marca comercial	Quantidade de substrato (g)	Quantidade de água (mL)
Amido de milho	Cortesia	60	36
Arroz integral tipo 1	Ráris	70	30
Arroz parboilizado tipo 1	Coradini	60	32
Arroz tipo 1	Namorado	60	32
Arroz tipo 2	Coradini	60	32
Aveia em flocos	Mais Vita	60	40
Canjiquinha	Cortesia	60	20
Farelo de trigo	Natu's	40	60
Farinha de mandioca crua	Cortesia	60	40
Farinha de milho amarela	Yoki	60	30
Farinha de trigo especial	Dona Benta	73	40
Fubá	Yoki	60	45
Milho em grãos	à granel	70	20
Polvilho azedo	Yoki	75	50
Soja em grãos	Natural Life	70	20
Trigo moído	Hikari	60	35
Turfa	Technes Agrícola	60	10

Os dados contidos na Tabela 1 foram baseados no trabalho de WENZEL *et al.* (2006) e correspondem às quantidades distribuídas em cada repetição.

Cada substrato foi distribuído em sacos de polipropileno e autoclavado a 1 atm e 120°C, durante 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar vertical foram inoculados 5 mL das suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 conídios/mL. Os sacos foram mantidos sobre prateleiras em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h durante 9 dias.

Os testes foram divididos em três experimentos, devido ao grande número de substratos. Os tratamentos foram compostos por seis repetições e cada uma delas corresponde a um saco. Após a análise estatística, foram selecionados os melhores substratos de cada um dos experimentos.

Para a determinação da concentração dos conídios, foi retirada, ao acaso, uma amostra de 1 g do substrato com fungo de cada saco plástico, que foi adicionado em 10 mL de água destilada esterilizada em tubo de ensaio. Após a agitação do tubo de ensaio, foram realizadas diluições em série (10^{-2}) para a contagem dos conídios em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Após a quantificação dos conídios, foram feitos os testes de viabilidade em placas de Petri de plástico com 9 cm de diâmetro, contendo BDA, utilizando 0,1 mL da suspensão de cada tratamento/placa. As placas foram submetidas à lâmpada germicida (radiação UV de 253,7 nm), distantes 25,0 cm da fonte de radiação, expostas à radiação por 25 e 50 segundos e incubadas por 15 horas em B.O.D. a 25°C . Um tratamento sem exposição à radiação também foi feito. Foram quantificados os números de conídios germinados e não germinados em microscópio ótico com objetiva de 400x, estabelecendo-se uma proporção de viabilidade.

Para os ensaios de temperatura utilizou-se a mesma metodologia utilizada na radiação ultravioleta, mas sendo que cada tratamento foi exposto a diferentes temperaturas: 20, 25, 30 e 35°C .

Ensaios de virulência: Para os experimentos de virulência foram realizadas oito repetições, contendo dez lagartas 3º instar de *D. saccharalis* para cada um dos tratamentos selecionados. Cada lote de lagartas foi pulverizado com 2 mL da suspensão de fungo, na concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL, em torre de Potter. As testemunhas foram pulverizadas com água destilada estéril. Em seguida, as lagartas foram transferidas para potes de plástico transparente com tampa de rosca. As lagartas foram alimentadas com colmos de cana-de-açúcar de 3,0 cm de altura. Cada inseto morto foi lavado em álcool 70% e água destilada esterilizada e transferido para placa de Petri contendo algodão umedecido para confirmação da mortalidade pelo entomopatógeno. As placas foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotofase de 12h e UR de $70 \pm 10\%$. Foi

avaliada diariamente a mortalidade das brocas por um período de dez dias.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo Teste F, a 1% de probabilidade e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa ESTAT – 2.0 Sistemas de Análises Estatísticas – desenvolvido na FCAV/ UNESP Campus de Jaboticabal, SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das concentrações obtidas nos 17 tratamentos avaliados estão apresentados na Tabela 2. Por meio destes, foram selecionados os substratos que apresentaram as maiores concentrações de conídios para *M. anisopliae* e *B. bassiana*: arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído (Tabela 3).

Os resultados demonstraram que, para *M. anisopliae* o meio de arroz pode ser substituído pelo fubá e o trigo moído, pois eles superaram o arroz tipo 1 em 6,80% e 12,56%, respectivamente, na produção de conídios. Para o fungo *B. bassiana* os meios avaliados não apresentaram superioridade de um substrato em relação aos demais (Tabela 3).

AQUINO (1974) comprovou a superioridade do meio de arroz em relação ao de batata-dextrose e o de amido, na frutificação e desenvolvimento do fungo em menor espaço de tempo. MARQUES; VILAS BOAS (1973) verificaram o bom crescimento e esporulação do fungo nesse meio e outros autores, como MOURA COSTA; MAGALHÃES (1974) e VILLACORTA (1977), utilizaram esse meio para o cultivo do fungo com sucesso.

WENZEL *et al.* (2006) verificaram que para *Lecanicillium lecanii* o arroz não foi o substrato mais produtivo, sendo que as maiores produções de conídios ocorreram nos substratos com trigo moído, farelo de soja e farelo de trigo, assim como MACHADO *et al.* (2009) que verificaram que farelo de trigo e lentilha, além de trigo grosso e sorgo, favoreceram a produção de conídios de *L. lecanii*.

Diante desses resultados verifica-se que substratos à base de trigo também são boas alternativas para a produção, desde que sejam economicamente viáveis.

A viabilidade de *M. anisopliae* não foi prejudicada pelo cultivo do fungo nos diferentes substratos, pois, apesar da diferença estatística observada em todos os tratamentos, a porcentagem de germinação foi maior que 94%. Para o fungo *B. bassiana*, não foi verificada diferença estatística e a porcentagem de germinação dos conídios também superou os 94% (Tabela 4).

Tabela 2 - Concentração média de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) e *Beauveria bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semissólidos após 9 dias de cultivo (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h).

Tratamentos (Experimento 1)	Concentração ($\times 10^8$ conídios/mL)			
	<i>M. anisopliae</i>		<i>B. bassiana</i>	
Arroz integral tipo 1	1,65	B	0,80	B
Arroz parboilizado tipo 1	2,40	A	0,71	B
Arroz tipo 1 (Testemunha)	2,10	AB	1,38	A
Arroz tipo 2	2,71	A	1,09	AB
Canjiquinha	2,25	AB	1,34	A
Teste F	7,16*		7,81*	
CV (%)	16,20		25,07	
Erro padrão da média	0,1469		0,0109	
Tratamentos (Experimento 2)	Concentração ($\times 10^8$ conídios/mL)			
	<i>M. anisopliae</i>		<i>B. bassiana</i>	
Arroz tipo 1 (Testemunha)	1,37	B	2,66	A
Aveia em flocos	1,71	B	0,92	BC
Farelo de trigo	1,47	B	0,35	C
Farinha de mandioca crua	0,38	C	0,92	BC
Farinha de milho amarela	1,94	AB	0,96	B
Fubá	2,57	A	1,18	B
Teste F	20,32*		32,87*	
CV (%)	25,03		28,74	
Erro padrão da média	0,1607		0,1368	
Tratamentos (Experimento 3)	Concentração ($\times 10^8$ conídios/mL)			
	<i>M. anisopliae</i>		<i>B. bassiana</i>	
Arroz tipo 1 (Testemunha)	1,40	B	2,19	A
Milho em grãos	0,82	C	1,13	C
Soja em grãos	0,80	C	1,14	C
Trigo em grãos	0,92	C	1,25	C
Trigo moído	1,83	A	1,60	B
Turfa	0,79	C	0,80	D
Teste F	79,52*		79,83*	
CV (%)	10,72		9,80	
Erro padrão da média	0,0478		0,0541	

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x} + 0,5$.

*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 3 - Concentração média de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) e *Beauveria bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semissólidos após 9 dias de cultivo (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h).

Tratamentos	Concentração ($\times 10^8$ conídios/mL)			
	<i>M. anisopliae</i>		<i>B. bassiana</i>	
Arroz parboilizado tipo 1	1,94	AB	1,41	A
Arroz tipo 1 (Testemunha)	1,91	AB	1,16	AB
Arroz tipo 2	1,94	AB	1,16	AB
Canjiquinha	1,36	B	1,08	B
Farinha de milho amarela	1,86	AB	1,14	AB
Fubá	2,04	A	1,34	AB
Trigo moído	2,15	A	1,30	AB
Teste F	2,99*		3,95*	
CV (%)	18,89		12,22	
Erro padrão da média	0,1455		0,0613	

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x} + 0,5$.

*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 4 - Viabilidade (%) de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) e *Beauveria bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semissólidos após 15 horas de incubação (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h).

Tratamentos	Viabilidade (%)	
	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
Arroz parboilizado tipo 1	94,67 C	97,08 A
Arroz tipo 1 (Testemunha)	98,25 AB	95,42 A
Arroz tipo 2	97,33 AB	95,25 A
Canjiquinha	96,00 BC	96,83 A
Farinha de milho amarela	98,83 A	94,58 A
Fubá	97,50 AB	97,25 A
Trigo moído	99,08 A	95,50 A
Teste F	7,52*	2,15 ^{ns}
CV (%)	1,45	1,82
Erro padrão da média	0,5777	0,7145

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

Analisando-se a viabilidade de *M. anisopliae*, nos substratos selecionados, observou-se que os maiores valores ocorreram nos substratos arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído (Tabela 4), concordando com os resultados obtidos nos estudos de VILAS BOAS *et al.* (1996).

Analisando-se os efeitos da radiação UV sobre os conídios de *M. anisopliae*, observou-se que houve diminuição gradativa da viabilidade à medida que se aumentou o tempo de exposição à radiação (Tabela 5). Em todos os tempos de exposição ao raio UV o único substrato que manteve sua viabilidade superior quando comparado aos outros foi a farinha de milho amarela. A viabilidade em 50 segundos de exposição foi de 23,67% e a do arroz tipo 1 foi de 4,17%. Apenas 25 segundos de exposição à radiação UV foram suficientes para baixar os índices de germinação dos conídios produzidos em trigo moído de 99,08% para 16,50% (Tabela 5).

Na análise feita com *B. bassiana*, novamente, a farinha de milho amarela se apresentou como um dos melhores substratos, seguido por canjiquinha (Tabela 5). Também a exposição por 25 segundos à radiação UV foi suficiente para baixar o índice de germinação dos conídios produzidos em arroz parboilizado tipo 1 de 97,08% para 32,67% (Tabela 5). Também pode ser observado que os conídios de *B. bassiana* no tempo de exposição de 50 segundos foram mais resistentes dos que os de *M. anisopliae*.

Segundo BRAGA *et al.* (2002), a maioria desses micro-organismos não possui proteção contra os efeitos deletérios da luz solar.

Os efeitos letais causados por luz UV (253 nm) foram demonstrados por CORRÊA (1983), FRIGO

(1983) e outros. Verifica-se que há uma grande variabilidade entre isolados e sugerem que os mais resistentes sejam utilizados em programas de melhoramento.

Analisando-se o efeito das temperaturas sobre os conídios de *M. anisopliae* produzidos nos substratos selecionados, observou-se que o arroz tipo 1 (testemunha), farinha de milho amarela, fubá e o trigo moído foram os que apresentaram bons resultados em toda a faixa de temperatura avaliada. A maior viabilidade de conídios é observada na temperatura de 25°C em todos os tratamentos (Tabela 6). Entre 30°C e 35°C não houve diferença significativa de viabilidade entre os tratamentos: arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído. Os resultados observados na temperatura de 20°C não têm diferença significativa dos resultados observados na temperatura de 30°C .

VILLACORTA (1978), trabalhando com diferentes isolados de *M. anisopliae*, verificou que a 37°C houve inibição da germinação de conídios tornando-os inviáveis quando eles eram submetidos por mais de 96 horas a essa temperatura. A temperatura máxima a que os fungos foram expostos no presente trabalho foi de 35°C . Nessa temperatura, a viabilidade dos conídios foi significativamente mais baixa do que a obtida a 25°C , considerada como temperatura ótima, comprovando o declínio de viabilidade a partir dos 30°C . Mesmo com as viabilidades mais baixas, quando expostas à temperatura de 35°C , a germinação dos conídios foi superior a 80% nos substratos arroz tipo 1, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído (Tabela 7).

Tabela 5 - Viabilidade (%) de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) obtida em substratos semissólidos, após variação de exposição à radiação ultravioleta (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h.).

Tratamentos	Viabilidade (%)					
	Sem exposição		25 segundos		50 segundos	
Arroz parboilizado tipo 1	94,67	C	a ¹	52,33	AB	b
Arroz tipo 1 (Testemunha)	98,25	AB	a	41,00	B	b
Arroz tipo 2	97,33	AB	a	18,50	C	b
Canjiquinha	96,00	BC	a	61,33	A	b
Farinha de milho amarela	98,83	A	a	53,33	AB	b
Fubá	97,50	AB	a	34,83	BC	b
Trigo moído	99,08	A	a	16,50	C	b
Teste F	7,52*			15,76*	84,44*	-
CV (%)	1,45			27,12	23,88	-
Erro padrão da média	0,5777			4,3947	0,9936	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

¹ Letras maiúsculas para comparação entre médias na coluna e minúsculas para comparação na linha.

*Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 6 - Viabilidade (%) de *Beauveria bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semissólidos, após variação de exposição à radiação ultravioleta (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.).

Tratamentos	Viabilidade (%)					
	Sem exposição		25 segundos		50 segundos	
Arroz parboilizado tipo 1	97,08	A	a ¹	32,67	BC	b
Arroz tipo 1 (Testemunha)	95,42	A	a	42,00	A	b
Arroz tipo 2	95,25	A	a	36,33	ABC	b
Canjiquinha	96,83	A	a	42,83	ABC	b
Farinha de milho amarela	94,58	A	a	46,67	AB	b
Fubá	97,25	A	a	50,83	A	b
Trigo moído	95,59	A	a	34,67	AB	b
Teste F	2,15 ^{ns}			4,90*	6,84*	-
CV (%)	1,82			22,26	14,74	-
Erro padrão da média	0,7145			3,5443	2,0989	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

¹ Letras maiúsculas para comparação entre médias na coluna e minúsculas para comparação na linha.

*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 7 - Viabilidade (%) de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) obtida em substratos semissólidos, após exposição em diferentes temperaturas.

Tratamentos	Temperatura				
	20°C	25°C	30°C	35°C	Teste F
Arroz parboilizado tipo 1	81,33	94,67	81,83	78,17	12,47*
Arroz tipo 1	80,67	98,25	83,67	80,67	59,63*
Arroz tipo 2	80,00	97,33	77,33	75,24	44,07*
Canjiquinha	77,67	96,00	79,00	71,17	69,38*
Farinha de milho amarela	86,00	98,83	84,17	80,67	40,86*
Fubá	82,67	97,50	81,50	80,17	41,99*
Trigo moído	82,17	99,08	84,33	84,33	26,26*
Teste F	2,80*	7,52*	3,52*	4,61*	-
CV (%)	4,62	1,45	4,30	5,80	-
Erro padrão da média	1,5371	0,5777	1,4329	1,8753	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.
¹Letras maiúsculas para comparação entre médias na coluna e minúsculas para comparação na linha.
*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.
CV = Coeficiente de variação.

Tabela 8 - Viabilidade (%) de *Beauveria bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semissólidos, após exposição em diferentes temperaturas.

Tratamento	Temperatura				
	20°C	25°C	30°C	35°C	Teste F
Arroz parboilizado tipo 1	72,17	97,08	72,33	25,67	149,45*
Arroz tipo 1 (Testemunha)	75,00	95,42	85,50	20,67	647,25*
Arroz tipo 2	67,50	95,25	79,17	24,67	773,75*
Canjiquinha	85,67	96,83	82,00	29,67	241,17*
Farinha de milho amarela	79,50	94,58	80,33	16,00	231,07*
Fubá	82,00	97,25	81,33	19,00	579,23*
Trigo moído	72,50	95,50	77,67	20,50	80,08*
Teste F	8,14*	2,15 ^{ns}	2,01 ^{ns}	4,22*	-
CV (%)	7,13	1,82	8,87	24,65	-
Erro padrão da média	2,2218	0,7145	2,8881	2,2455	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.
¹Letras maiúsculas para comparação entre médias na coluna e minúsculas para comparação na linha.
*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.
^{ns}não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.
CV = Coeficiente de variação.

Tabela 9 - Mortalidade confirmada (%) de lagartas de 3^o instar de *Diatraea saccharalis* após aplicação das diferentes suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, obtidas em meios de cultura semissólidos (Temperatura de 25 ± 1°C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 12 h).

Tratamentos	Mortalidade Confirmada (%)			
	<i>M. anisopliae</i>		<i>B. bassiana</i>	
Arroz parboilizado tipo 1	95,00	A	98,75	A
Arroz tipo 1 (Testemunha)	91,25	AB	98,75	A
Arroz tipo 2	85,00	AB	98,75	A
Canjiquinha	87,50	AB	98,75	A
Farinha de milho amarela	75,00	B	93,75	A
Fubá	90,00	AB	93,75	A
Trigo moído	85,00	AB	100,00	A
Testemunha (água destilada)	3,75	C	2,50	B
Teste F	59,10*		118,83*	
CV (%)	14,42		10,20	
Erro padrão da média	0,3903		0,3089	

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

*significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

A mesma análise executada sobre os dados obtidos com *B. bassiana* mostrou que as maiores viabilidades ocorreram nos seguintes substratos, de acordo com a temperatura aplicada: 20°C – canjiquinha, farinha de milho amarela e fubá; 25°C – não foi observada diferença significativa entre os tratamentos; 30°C – arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído; 35°C – arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2 canjiquinha e trigo moído. Na temperatura de 30°C, os substratos arroz tipo 1 (testemunha) e arroz tipo 2, apresentaram aumento de viabilidade, comparando-se com a temperatura de 20°C. Os demais substratos não apresentaram diferença significativa comparando-se à viabilidade obtida com estes, aos 20 e 30°C (Tabela 8). Os conídios de *B. bassiana* são bastante sensíveis em temperaturas acima de 30°C ocorrendo menor viabilidade a partir dessa temperatura. Na temperatura de 35°C, a porcentagem de germinação variou nos diferentes substratos entre 16 e 29,67%.

Os fungos mitospóricos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Nomuraea rileyi* apresentam faixas de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de 24 a 30°C, 22 a 26°C e 20 a 30°C, respectivamente (ALVES, 1998).

Através da confirmação da mortalidade das lagartas de *D. saccharalis*, observou-se que os conídios do fungo *M. anisopliae* apresentaram maior virulência quando produzidos em arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, fubá e trigo moído, sendo que mortalidade confirmada foi igual ou superior a 85%. A menor porcentagem

de mortalidade foi observada no tratamento com farinha de milho amarela (75%) (Tabela 9). No caso de *B. bassiana* não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que todos, apresentaram maior virulência do que *M. anisopliae* variando entre 93,75% (farinha de trigo amarela) e 100% (trigo moído) de mortalidade confirmada (Tabela 9).

MACEDO *et al.* (1990) observaram que *B. bassiana* provocou, com a mesma dosagem, mortalidade entre 38 e 80% quando inoculado em *D. saccharalis*, enquanto que *M. anisopliae* provocou mortalidade entre 18 e 50%, quando inoculado neste inseto. No presente trabalho, a mortalidade confirmada para *B. bassiana* variou entre 93 e 100% e *M. anisopliae* apresentou mortalidade entre 75 e 95%.

CONCLUSÕES

Os melhores substratos para a produção de conídios de ambos os fungos, *M. anisopliae* e *B. bassiana* são: arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído e a viabilidade dos conídios produzidos foi alta.

A radiação UV influencia a viabilidade dos conídios produzidos, sendo *B. bassiana* mais sensível do que *M. anisopliae*;

A temperatura de 35°C afeta a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*;

Os conídios dos fungos, *M. anisopliae* e *B. bassiana*, produzidos nos diferentes substratos são patogênicos às lagartas 3^o instar de *D. saccharalis*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano. In: _____. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-711.
- AQUINO, M.L.N. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas*, v.72, p.1-26, 1974.
- BATISTA FILHO, A.; CARDELLI, M.A. Viabilidade dos esporos de *B. bassiana* (Bals.) Vuill. isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. *Biológico*, São Paulo, v.52, p.57-59, 1986.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, C.D.; FREIMOSER, F.; LEGER, R.J.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage to fungi from solar-UV exposure, and genetic and molecular-biology approaches to mitigation. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 2002, Londrina, PR. *Proceedings*. Londrina: 2002. p.241-245.
- CORRÊA, G.S. *Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. 1983. 84f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.
- 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*, v.135, p.171-181, 1996.
- FRIGO, S.M. *Variabilidade e fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. 1983. 116f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.
- GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRIGHT, S.P. Fungi. In: _____. *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.255-282.
- MACEDO, N.C.; ALVES, S.B.; SALOMÃO, R.; BOTELHO, P.S.M. Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) criadas em diferentes espécies vegetais aos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Ecossistema*, v.15, p.19-23, 1990.
- MACHADO, A.C.R.; MONTEIRO, A.C.; MOCHI, D.A.; YOSHIDA, L. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para a produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. *Bragantia*, v.68, n.3, p.703-714, 2009.
- MARQUES, E.J.; VILLAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal) no Nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL, 1., 1973, Viçosa, MG. *Livro de Resumos*. Viçosa: 1973. p.70.
- MOURA-COSTA, M.D.; MAGALHÃES, C.D. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, parasito da “cigarrinha” das pastagens. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, v.13, p.57-60, 1974.
- NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.3, p.548-572, 2000.
- VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.39, n.1, p.123-128, 1996.
- VILLACORTA, A. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in granular form. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.5, p.101-104, 1977.
- VILLACORTA, A. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3.; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5., 1978, Bahia, *Livro de Resumos*. Bahia: 1978. p.70.
- WENZEL, I.M.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* substratos sólidos obtidos de grãos. *Científica*, v.34, n.1, p.7-14, 2006.

Recebido em
Aceito em