

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E
Beauveria bassiana (BALS.) VUILL. EM DIFERENTES SUBSTRATOS E
EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E DA TEMPERATURA
SOBRE ESTRUTURAS INFECTIVAS DESSES ENTOMOPATÓGENOS**

EMMA LUIZE OTTATI-DE-LIMA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E
Beauveria bassiana (BALS.) VUILL. EM DIFERENTES SUBSTRATOS E
EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E DA TEMPERATURA
SOBRE ESTRUTURAS INFECTIVAS DESSES ENTOMOPATÓGENOS**

EMMA LUIZE OTTATI-DE-LIMA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Batista Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Ottati-de-Lima, Emma Luize, 1975-
087p Produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)SOROK. e *Beauveria bassiana* (BALS.)VUILL. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos / Emma Luize Ottati-de-Lima . - Botucatu : [s.n.], 2007
viii, 92 f. : il. color, gráfs, tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007
Orientador: Antonio Batista Filho
Inclui bibliografia.

1. Fungos patogênicos. 2. Pragas - Controle biológico. 3. Cultura e meios de cultura(Biologia). 4. Radiação ultravioleta. I. Batista Filho, Antonio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III.Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. EM DIFERENTES SUBSTRATOS E EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E DA TEMPERATURA SOBRE ESTRUTURAS INFECTIVAS DESSES ENTOMOPATÓGENOS.


ALUNA: EMMA LUIZE OTTATI DE LIMA

ORIENTADOR: DR. ANTONIO BATISTA FILHO


Aprovado pela Comissão Examinadora




DR. ANTONIO BATISTA FILHO



PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROF. DR. JOSÉ EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA



DR. LUIS GARRIGOS LEITE

Data da Realização: 05 de fevereiro de 2007.

Aos meus pais, Luiz e Ema
e aos meus irmãos Angelo e Júnior.

DEDICO

A Deus, por tudo que me tem concedido.

AGRADEÇO

Ao meu marido Paulo e
minha filhinha Luize, pela
colaboração, compreensão,
estímulo e carinhos sempre
recebidos.

OFEREÇO

“Ensinar não é uma função vital,
porque não tem o fim em si mesma;
a função vital é aprender”.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Ao meu eterno professor Dr. Antonio Batista Filho, Diretor, Pesquisador Científico do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico e Professor Credenciado do Departamento de Produção Vegetal da FCA/ UNESP/ Botucatu, pela preciosa orientação, amizade e confiança.

Ao Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, Diretor e Pesquisador Científico do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, pela co-orientação e amizade.

Ao Dr. Carlos Frederico Wilcken, Professor do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/ Botucatu), pelo incentivo e por ter me introduzido à área acadêmica.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso.

Ao técnico André da Usina São João, Araras, SP por ter cedido todas as lagartas de *Diatraea saccharalis* necessárias à realização deste trabalho.

Ao Instituto Biológico do Estado de São Paulo por ter cedido toda a infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

Ao Paulo Camargo, funcionário do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, pelo apoio recebido.

Aos Pesquisadores Científicos do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, Dr. Laerte Antonio Machado, Dr. Luis Garrigós Leite e Dr. Valmir Antonio Costa.

Aos estagiários Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, César Augusto Domene Filho, Fernando Henrique Carvalho Giometi, Lucas e Thaís Goulart.

À estagiária Aline Maria Belasco de Almeida, pela amizade e ajuda preciosa nos experimentos, que pareciam não ter fim.

Ao estagiário Luciano Olmo Zappellini pela ajuda, amizade e as “10 melhores da avó”.

À minha estimada amiga Mariana Hollanda Gassen pela verdadeira amizade, apoio, ajuda indispensável em quase todos os experimentos e, nesta fase delicada da mudança.

À Érica Cintra e Inajá Wenzel pela amizade e estímulo sempre presentes.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Área de concentração: Proteção de Plantas pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação pelo convívio e oportunidade de intercâmbio de idéias: Fernando Tavares e Alexandre Candido.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal Nivaldo Lúcio Costa e à secretária Vera Lúcia da Silva Mendes pelo apoio concedido.

Ao meu esposo Paulo pela correção do Summary, e por ter me ajudado na análise estatística. Também por me dar tanto orgulho e segurança, ser muito dedicado à nossa família, e nos fazer muitos felizes.

À minha princesinha Luize, por me trazer tanta alegria todos os dias e achar que o trabalho da mamãe é só limpar “cocô” de lagartas no laboratório.

À minha amiga e madrinha Sandia Bergamaschi Pezerico pela amizade sincera desde os tempos da Graduação.

Ao meu pai Luiz, minha mãe Ema, meus irmãos Angelo e Júnior, pelo carinho e apoio a mim sempre dedicados, em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada!

Ao Sr. Paulo, D. Regina, Thiago, Júlio, Daniele, Guilherme, Gabriela, Luís Geraldo, Michéle, Ana Luísa, Ana Clara e Pedrinho, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Controle microbiano	8
2.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	10
2.3 <i>Beauveria bassiana</i>	11
2.4 Produção de fungos entomopatogênicos	13
2.4.1 Produção em meio semi-sólido	18
2.4.1.1 Produção de conídios.....	21
2.4.2 Produção em meio líquido.....	25
2.4.2.1 Produção de blastosporos	28
2.5 Fatores ambientais	29
2.5.1 Radiação ultravioleta	29
2.5.2 Temperatura.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	34
3.2 Condição de esterilização	35
3.3 Repicagem de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	35
3.4 Produção semi-sólida de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	35
3.4.1 Concentração de conídios.....	38
3.4.2 Viabilidade de conídios	39
3.4.2.1 Radiação ultravioleta	39
3.4.2.2 Temperatura.....	40
3.4.3 Virulência à <i>Diatraea saccharalis</i>	40
3.5 Produção líquida de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	42
3.5.1 Meio para produção de blastosporos	42
3.5.2 Concentração de blastosporos	44
3.5.3 Contagem de colônias.....	45
3.5.3.1 Radiação ultravioleta	45
3.5.3.2 Temperatura.....	46
3.5.4 Virulência à <i>Diatraea saccharalis</i>	46
3.6 Análise estatística	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Produção semi-sólida de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	47
4.1.1 Concentração de conídios.....	47
4.1.2 Viabilidade de conídios	53
4.1.2.1 Radiação ultravioleta	54
4.1.2.2 Temperatura.....	58
4.1.3 Virulência à <i>Diatraea saccharalis</i>	62
4.2 Produção em meio líquido de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	64
4.2.1 Concentração de blastosporos	64
4.2.2 Contagem de colônias.....	70

4.2.2.1 Radiação ultravioleta	70
4.2.2.2 Temperatura.....	72
4.2.3 Virulência à <i>Diatraea saccharalis</i>	75
5 CONCLUSÕES	77
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar diferentes meios de cultura na produção, semi-sólida e líquida, de propágulos de fungos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, bem como a tolerância desses propágulos a ação da radiação ultravioleta e da temperatura. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, em Campinas, SP. Foram realizados, para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, 6 repetições para cada um dos 17 tratamentos: amido de milho, arroz integral, arroz parboilizado, 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. A viabilidade foi feita em placas de Petri plásticas contendo BDA. Para os ensaios com radiação ultravioleta e temperatura, utilizou-se a mesma metodologia para a viabilidade, mas cada tratamento sendo exposto à radiação por 0, 25 e 50 segundos e, em diferentes temperaturas: 20, 25, 30 e 35°C. Inoculou-se, em torre de Potter, 2 mL da suspensão de fungo de cada tratamento em lagartas de *Diatraea saccharalis*. Para a concentração os melhores tratamentos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram: arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1, arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído. A viabilidade de todos os tratamentos foi superior a 94,00%; quanto maior o tempo de exposição ao ultravioleta menor foi o número de conídios férteis. À temperatura de 35°C ocorreu perda significativa da viabilidade de conídios e todos os tratamentos se mostraram virulentos. Para a

produção líquida de blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, foram avaliados 12 tratamentos, com 6 repetições cada, compostos pelas combinações entre as concentrações de Carbono (C), na forma de D-glicose anidra (40% de carbono) e sacarose (42,11% de carbono), e Nitrogênio (N) na forma de levedura de cerveja (7,31% de nitrogênio). Cada tratamento de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi constituído de 6 Erlenmeyers com 100 mL de meio, autoclavados a 1 atm e 120°C, durante 20 minutos. As concentrações de blastosporos de cada tratamento foram determinadas com 4, 6 e 8 dias após a inoculação. Para os ensaios de contagem de colônias em ultravioleta e temperatura, utilizou-se a mesma metodologia para a viabilidade da produção sólida. Para a concentração de blastosporos os melhores tratamentos de *M. anisopliae* foram: 16,00 g C + 7,00 g N e 14,40 g C + 7,00 g N e para *B. bassiana* foi 20,00 g C + 6,30 g N e 20,00 g C + 7,00 g N. A viabilidade de todos os tratamentos foi superior a 10 colônias formadas; quanto maior o tempo de exposição ao ultravioleta menor foi o número de colônias formadas; à temperatura de 35°C ocorreu diminuição significativa na formação de colônias e todos os tratamentos se mostraram virulentos.

Palavras chave: controle biológico, controle microbiano, Deuteromycotina, fungos entomopatogênicos, Insecta, meios de cultura.

PRODUCTION OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK AND *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. ON DIFFERENT MEDIA AND EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION AND TEMPERATURES ON THE INFECTIVE PROPAGULES OF THESE FUNGI. Botucatu, 2007. 99p. Thesis (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: EMMA LUIZE OTTATI-DE-LIMA

Adviser: ANTONIO BATISTA FILHO

SUMMARY

The goals of this work were to evaluate different medias (semi-solid and liquid) as for the production of *M. anisopliae* and *B. Bassiana* propagules, and also the tolerance of these propagules to ultraviolet radiation and temperature. The experiments were carried out at the Biological Control Laboratory of the “Instituto Biológico”, at Campinas, São Paulo, Brazil. For both *M. anisopliae* and *B. bassiana*, 6 repetitions were performed for each one of the 17 treatments: corn starch, full rice, parboiled rice, type 1 rice, type 2 rice, oat flakes, “canjiquinha”, 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 each one of the bioassays in ultraviolet and temperature exposition, the same methodology was used for viability analysis, but each treatment was exposed to the UV radiation during 0, 25 and 50 seconds, and at different temperatures: 20, 25, 30 and 35°C. Using the Potter tower, 2 mL of fungus suspension, from each treatment, were inoculated into the *Diatraea saccharalis* caterpillars. Regarding the sporulation, the best *M. anisopliae* and *B. bassiana* treatments were: parboiled rice, type 1 rice, type 2 rice, yellow corn flour, corn flour and crushed wheat. The viability of all the treatments was superior to 94,00%. Also, as longer was the duration of the exposition to the UV, as smaller was the number of fertile conidia. At 35°C, a significant loss of conidia viability was observed, and all the treatments have shown some level of virulence. For the *M. anisopliae* and *B. bassiana* blastospores production over liquid media, 12 treatments were

evaluated, with 6 repetitions each, composed by the combinations of carbon (C), presented as D-glicose anidra (40% Carbon) and sucrose (42,11% Carbon), and Nitrogen (N), presented as brewer yeast (7,31% Nitrogen), concentrations. Each *M. anisopliae* and *B. bassiana* treatment was composed by 6 Erlenmeyers with 100 mL of media, sterilized at 1 atm and 120°C, during 20 minutes. The blastospores concentration of each treatment was determined with 4, 6 and 8 day after the inoculation. For each one of the colony counting bioassays in UV and temperature exposition, the same methodology was used for viability analysis. Regarding blastospores concentration, the best *M. anisoplie* treatment swere: 16,00 g C + 7,00 g N and 14,40 g C + 7,00 g N, and for the *B. bassiana*, hey were 20,00 g C + 6,30 g N and 20,00 g C + 7,00 g N. The viability of all treatments was superior to 10 formed colonies; as longer was the exposition to the UV rays duration, as smaller was the number of formed colonies; at 35° C a significant decreasing in the number of formed colonies occurs and all treatments have shown themselves virulent.

keywords: biological control, microbiological control, Deuteromycotina, entomopatogenic fungi, Insecta, culture media.

1 INTRODUÇÃO

No controle de pragas podemos classificar o controle microbiano é considerado muito promissor e dentre os agentes de controle microbiano de pragas de importância econômica destacam-se os fungos, devido à abundância de gêneros e espécies (ALVES, 1986b e 1992; ZIMMERMANN, 1982).

Com o aumento do interesse em soluções ecologicamente corretas, devido em grande parte à conscientização em relação ao mal uso de agrotóxicos, aumentou também o interesse pela exploração de fungos entomopatogênicos na agricultura. Porém, do ponto de vista prático, a escala de produção desses fungos deve ser proporcional à escala de produção agrícola, ou seja, é necessário que sejam produzidos em grande quantidade. Entretanto, existem limitações para aplicação de fungos, e uma delas é a forma de conservação desses microorganismos, que mantenha a sua patogenicidade e virulência em condições de fácil armazenamento e aplicação. Este fator está intrinsecamente ligado às formulações dos fungos entomopatogênicos (ALVES, 1986b).

A maioria dos projetos de pesquisa com controle microbiano de insetos é realizada com fungos entomopatogênicos, devido às características de ação desses patógenos, pois atuam por contato e ingestão. Os fungos foram os primeiros agentes a serem aplicados no controle microbiano de insetos, com cerca de 80% das doenças de insetos causadas por esses patógenos (ALVES, 1986b; ALMEIDA & MACHADO, 2006).

No Brasil, esses patógenos vêm sendo estudados há mais de cinquenta anos, sendo que após, 1964, com a aplicação em massa do fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle de cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*, o uso desses entomopatógenos aumentou, criando assim novas oportunidades de projetos de pesquisa ou mesmo a instalação de biofábricas (ALMEIDA & MACHADO, 2006).

Os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* são os mais estudados e utilizados no Brasil, devido à ampla gama de insetos que podem ser controlados por estes, e também pela facilidade de produção em laboratório (ALMEIDA & MACHADO, 2006).

M. anisopliae vem sendo utilizado desde 1969, no Estado de Pernambuco, em programa de controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (*M. posticata*). A produção é feita em arroz e armazenada em sacos plásticos, em câmara frigorífica, à temperatura de 2 a 5°C. Somente em 1980, mais de 100.000 hectares de cana-de-açúcar foram pulverizados com este fungo para controle desses insetos, obtendo-se mortalidade de aproximadamente 23% para ninfas e 40% para adultos (ALVES, 1982).

No Brasil, desde 1970 quando o *M. anisopliae* começou a ser produzido em escala comercial, o arroz continua sendo o meio de cultura mais utilizado em suas diversas formas, grão inteiro, quebrado, farelo, etc. Vários outros meios de cultura foram testados entre eles o fubá de milho, farinha de arroz, soja, farelo de trigo, batatinha (GUAGLIUMI et al., 1974), caldo de feijão (CRUZ et al., 1983), milho em suas várias formas (SILVEIRA, 1987; MENDONÇA & COSTA, 1987), arroz úmido e macerado de feijão (RAGA et al., 1987), melão, farinha de soja e sais minerais (ALVES, 1986b).

Apesar de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* serem fungos altamente patogênicos 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, 1986b; ALMEIDA & MACHADO, 2006).

Mais suscetíveis às condições no campo, os entomopatógenos estão sujeitos a fatores bióticos e abióticos, que influenciam na sua sobrevivência, propagação e

infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Entre os abióticos, a radiação solar UV é a mais importante (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001b; CAGAN & SVERCEL, 2001), pois pode inativar o conídio, provocar danos letais ao DNA e mutações (NICHOLSON et al., 2000). Em geral, os efeitos da radiação UV reduzem a eficiência do fungo no campo (BRAGA et al., 2001a).

A temperatura é um dos fatores de grande importância e atua sobre os patógenos afetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo. Esse fator, torna-se ainda mais importante, tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura através de sistemas fisiológicos (ALVES, 1982). A viabilidade e atividade biológica de fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pela temperatura, umidade, substrato, radiação ultravioleta e outros fatores (ABREU et al., 1983; BATISTA FILHO & CARDELLI, 1986; ALVES et al., 1987).

Também tem sido estudada a produção em meios líquidos através de fermentadores visando a obtenção de propágulos (McCOY et al., 1975); Agudelo & Falcon (1983), Thomas et al. (1986) e Rombach et al. (1986). Este processo de produção apesar de ser um dos mais promissores ainda necessita de criteriosos estudos quanto à economicidade e adequabilidade dos substratos, padronização, virulência e efetividade dos produtos obtidos (ALVES & PEREIRA, 1989).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar diferentes meios de cultura na produção semi-sólida e líquida de propágulos de fungos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, bem como o efeito dos meios na suscetibilidade dos propágulos contra a radiação ultravioleta e temperaturas extremas, e na virulência dos fungos à *Diatraea saccharalis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle microbiano

De um total de mais de 2,5 milhões de espécies de insetos, estima-se que a ciência conheça cerca de 1 milhão. Cerca de 10% desse total conhecido podem ser consideradas pragas, quer sejam elas urbanas ou da agricultura. Assim, segundo Alves (1998b), a patologia de insetos e o controle microbiano terão importância relevante no controle de insetos praga.

Iniciada no Brasil há cerca de 70 anos, a patologia de insetos tem como principal meta o controle microbiano. Este, por sua vez, vem ganhando cada vez mais importância por visar a manutenção da população de pragas abaixo do nível de dano econômico (ALVES, 1998b).

A maioria dos projetos de pesquisa com controle microbiano de insetos são com fungos entomopatogênicos, devido às características de ação desses patógenos, pois atuam por contato e ingestão, possuem em grande quantidade na natureza sendo o solo o seu maior reservatório e por serem mais difícil dos insetos tornarem-se resistentes pela sua grande variabilidade genética (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

As diferentes estruturas do fungo a serem utilizadas no controle de

pragas e suas funções no ciclo natural do patógeno são: a) conídios: com função de reprodução e de disseminação; b) blastosporos: com função de disseminação na hemolinfa do hospedeiro; c) micélio: com função de migrar para fora do hospedeiro e permitir a conidiogênese do fungo; d) esporos de resistência: com função de permitir a sobrevivência do fungo no solo. Grande parte dos fungos mitospóricos pertencentes à classe-forma Hifomicetes pode ser utilizada na forma de conídios, blastosporos e micélio, sendo as duas primeiras formas geralmente preferidas por serem ambas infectivas ao hospedeiro. A escolha da forma a ser utilizada do fungo vai depender da espécie e isolado do patógeno, da dificuldade na sua produção, do ambiente onde será aplicado e do método de aplicação (LEITE et al., 2003; ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, luz, umidade, radiação solar e condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro e apresenta as seguintes fases: a) adesão: os mecanismos envolvidos na adesão ainda não são totalmente conhecidos. Existem forças eletrostáticas envolvidas, além de relações de umidade e temperatura; b) germinação: quando o fungo encontra condições favoráveis de umidade (acima de 90%), temperatura de 23 a 30°C, pH (5,5 a 7,0), oxigênio e nutrição, o fungo germina produzindo o tubo germinativo; c) formação de apressórios: numa dilatação na extremidade do tubo germinativo. Nesta dilatação ocorre a migração de conteúdo citoplasmático tornando esta área num ponto de intensa atividade metabólica; d) formação do grampo de penetração: pode ocorrer uma diferenciação da hifa no apressório, tornando-a mais saliente, transformando-a numa espécie de grampo para perfuração da cutícula do inseto; e) penetração: na penetração estão envolvidos os processos físico e químico, sendo que neste ocorre a liberação de enzimas tais como: quitinases, lipases e proteases, que facilitam a penetração mecânica; f) colonização: a hifa penetra e inicia o crescimento e colonização do corpo do inseto a partir dos corpos gordurosos, passando para o tubo digestivo, causando paralisação da alimentação e interrupção alimentar, atinge o sistema nervoso causando a paralisação do inseto, os músculos, tornando o inseto rígido e atinge a traquéia por onde sai o corpo do inseto para se reproduzir; g) reprodução: o fungo pode se reproduzir por processos sexual ou assexual, sendo que a maioria dos trabalhos realizada para o controle de pragas é com a fase assexuada (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

Segundo Almeida & Batista Filho (2006), os sintomas de insetos doentes com fungos são: manchas escuras pelo corpo, paralisação da alimentação, paralisia geral, perda de coordenação de movimentos. Posteriormente o tegumento torna-se róseo, para depois assumir coloração esbranquiçada, devido o crescimento do micélio e a partir da esporulação o inseto assume a coloração da espécie do fungo. Exemplo: branco para *Beauveria bassiana* e verde para *Metarhizium anisopliae*. Todas essas fases ocorrem em 4 a 10 dias, dependendo do hospedeiro e da espécie do fungo.

2.2 *Metarhizium anisopliae*

O fungo *M. anisopliae* é a espécie mais importante nas condições do Brasil, apresentando grande variabilidade genética decorrente da heterocariose, resultando o aparecimento de muitos isolados, com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência ao UV (ALVES, 1986a). *Metarhizium* é um fungo mitospórico da família-forma Moniliaceae caracterizado por atacar um grande número de espécies de insetos (ALVES, 1998a).

Este fungo encontra-se distribuído de forma ampla na natureza, sendo encontrado nos solos, sobrevivendo por longos períodos. A capacidade de sobrevivência dos esporos é variável em função do ambiente onde foi aplicado, da temperatura, umidade, radiação solar, etc. (ALVES, 1986a). Os insetos atacados por este fungo tornam-se mumificados e o cadáver pode apresentar coloração que varia de verde claro a escuro, acinzentados ou ainda esbranquiçados com pontos verdes. Esta doença é conhecida como muscardine verde (ALVES, 1998a).

A espécie *M. anisopliae* tem sido usada em diversos países, como Estados Unidos, Canadá, França, Austrália, África e Brasil (FARQUES et al., 1997; LOMER et al., 2001; BRAGA et al., 2001b). Esta espécie ataca inúmeras espécies de insetos, e está

amplamente distribuído na natureza (ALVES, 1998a). Seus conídios podem ser elipsóides ou ovóides e sua coloração pode variar de verde pálida a verde oliva.

Acredita-se que este entomopatógeno ocorra naturalmente em mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, incluindo pragas importantes como larvas de curculionídeo (praga da beterraba), *Mahanarva posticata* (cigarrinha-de-folhas da cana-de-açúcar) e *M. fimbriolata* (cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar) (ALVES, 1998a).

O fungo *M. anisopliae* ocorre em diversas regiões do mundo e com uma vasta amplitude de hospedeiros. No Brasil, vem sendo usado com sucesso para o controle das cigarrinhas das pastagens e de cana-de-açúcar (TANZINI, 2002), e é comercializado de quatro formas: em arroz inteiro, arroz triturado, em conídios puros e em formulação oleosa. No Estado de São Paulo tem sido usado com sucesso no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *M. fimbriolata* (MACEDO et al., 1997; MENDONÇA FILHO et al., 2001; ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2003).

2.3 *Beauveria bassiana*

O gênero *Beauveria* desenvolve-se em grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos. Os insetos atacados por este patógeno apresentam-se cobertos por micélio branco que esporula em condições adequadas de umidade e luz. Recebe o nome de muscardine branca a doença ocasionada por este gênero (ALVES, 1998a). A infecção ocorre geralmente por via tegumentar e oral, sendo possível à penetração pelo sistema respiratório, pelo espiráculo (ROBINSON, 1966).

A relação patógeno-hospedeiro depende das espécies de insetos e das condições durante a ocorrência da doença. São condições favoráveis a alta umidade relativa e temperatura, sendo que temperaturas altas e baixas retardam o desenvolvimento da doença (BARSON, 1977).

A espécie *B. bassiana* *Metarhizium* é um fungo mitospórico da família-forma Moniliaceae também apresenta ampla variedade de hospedeiros sendo encontrada em diversos países controlando vários insetos-praga (FERRON, 1978; FENG et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 2002) como, por exemplo, mosca-branca e afídios na América do Norte e América do Sul (GOETTEL et al., 2000). Os conídios deste fungo apresentam coloração clara.

Nos Estados Unidos, diversas formulações à base de *B. bassiana* têm sido testadas com sucesso no controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (McCOY & TIGANO-MILANI, 1992). No Brasil, *B. bassiana* tem-se destacado como agente de controle biológico com potencial para ser empregado no controle de populações de adultos desse inseto (COUTINHO & CAVALCANTI, 1988; COUTINHO & OLIVEIRA, 1991). As biofábricas têm produzido e comercializado este entomopatógeno em arroz inteiro e triturado, sendo também muito utilizado para o controle de cochonilhas dos citros, cupins de montículo, moleque-de-bananeira e broca-do-café (ALVES et al., 1998a). Algumas instituições de pesquisa têm tentado formular conídios deste fungo em óleo, como já ocorre com *M. anisopliae* (ALMEIDA & BATISTA FILHO 2006).

No Brasil, o fungo *B. bassiana* ocorre em mais de 30 espécies de insetos. Já foi estudado para o controle de *Diatraea saccharalis* (ALVES, 1986b); de hemípteros, como o percevejo do colmo-do-arroz, *Tibraca limbativentris* (MARTINS & LIMA, 1994); para *Triatoma infestans*, vetor da doença-de-Chagas (LUZ et al., 1998); *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Euschistus heros* (pragas da soja) (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998). Em outros países foi estudado visando ao controle do coreídeo *Riptortus linearis* (praga da soja) (HU et al., 1996), e *Leptoglossus zonatus* (Coreidae) e *Pachycoris klugii* (Scutelleridae) (pragas da noqueira) (GRIMM & GUHARAY, 1998).

2.4 Produção de fungos entomopatogênicos

As estruturas mais produzidas e comercializadas de *M. anisopliae* são os conídios, utilizando-se meio de cultura sólido. Esse processo tem sido usado para a manutenção rotineira de isolados e produção em pequena escala de conídios visando estudos de laboratório, bem como a produção em grande escala visando testes de campo e comercialização. O fungo é produzido na superfície de meio sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

A produção dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* tem sido feitas no Brasil por algumas indústrias particulares e por organizações oficiais. Estes fungos apresentam uma grande variabilidade natural e as organizações produtoras não tem dado a esse fato a importância que merece. Normalmente, a produção inicia-se através do isolamento do fungo de um inseto atacado. Não se conhecem a virulência, capacidade de produção de esporos, viabilidade e outras características importantes da cepa a ser produzida (ALVES, 1982).

As técnicas de produção de fungos para controle de pragas devem ter baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração e formas viáveis e virulentas do patógeno, que possam ser formuladas e utilizadas (ALVES, 1982).

Os isolados de *M. anisopliae* IBCB 348 e IBCB 425 são hoje utilizados pela maioria das empresas produtoras de fungos entomopatogênicos do Brasil. A transferência do conhecimento foi realizada através de projetos de implantação de seis biofábricas no Estado de SP e o treinamento de 85 profissionais, inclusive de outros Estados da federação (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

A produção do fungo no período de 2002/ 2003, por empresas e usinas sediadas no Estado, foi de 268 toneladas. O valor médio de comercialização foi de R\$ 10,00/kg e a receita bruta no período foi de R\$ 2.680.000,00. A atividade gerou 148 empregos diretos e a área de cana tratada atingiu 161.910 ha. O valor médio do tratamento foi de R\$ 40,00/ha, enquanto o tratamento químico teve custo de R\$ 160,00/ha. A economia média gerada por hectare foi de R\$ 120,00, totalizando uma economia global de R\$ 19.429.200,00,

além do fato de que 3.238 toneladas de inseticidas deixaram de ser aplicadas (ALMEIDA & BATISTA FILHO 2006).

No período de 2004/ 2005, segundo Almeida & Batista Filho (2006), a área aplicada com o fungo foi de aproximadamente 200.000 ha, sendo que mais uma biofábrica iniciou a produção. O custo de aplicação e o valor de bioinseticida comercializado não variaram em relação ao período anterior.

No entanto, a maioria dos entomopatógenos, incluindo os fungos entomopatogênicos, não estão disponíveis em quantidades e formulações adequadas para serem utilizados no controle de pragas. Para serem utilizados com eficiência no controle microbiano de insetos, atuando como inseticidas biológicos na estratégia chamada introdução inundativa, esses patógenos necessitam estar disponíveis em grandes quantidades. Isso se deve ao fato que os insetos normalmente necessitam de elevado potencial de inóculo para serem colonizados por estes patógenos (ALVES, 1998b).

São produzidos e comercializados para o controle de pragas de diversas culturas na Europa cerca de 100 agentes de controle biológico e, juntamente com insetos polinizadores, movimentaram aproximadamente US\$ 70 milhões em 1991 (LENTEREN et al., 1997). Segundo Faria & Magalhães (2001), no Brasil as quatro maiores empresas produziram em torno de 155 toneladas entre os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Sporothrix insectorum*, para o controle de cigarrinhas, ácaros, brocas, cochonilhas e do percevejo-de-renda.

A produção em escala industrial de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para uma determinada praga. A pesquisa de novas metodologias de sistemas de produção é muito importante para tornar o controle microbiano de pragas economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas (TANZINI, 2002).

A seleção de um meio padrão e o conhecimento das condições de cultivo mais adequadas para uma espécie ou linhagem são dois dos fatores mais importantes na produção massal de fungos entomopatogênicos para garantir bom crescimento com alta esporulação (KHALIL et al., 1985). Segundo Verhaar & Hijwegen (1993), a produção de esporos pode variar consideravelmente e causar problemas na obtenção de conídios.

Um meio de cultura deve possuir, basicamente, uma fonte de carbono (C) e nitrogênio (N), sais minerais e alguns fatores de crescimento (SOPER & WARD, 1981). As fontes de C geralmente utilizadas são: amido, glicose, sacarose, dextrose e diversos outros açúcares, enquanto que as fontes de N são geralmente componentes ricos em proteína e/ ou aminoácidos, como extrato de soja e outros subprodutos vegetais, extrato de levedura e peptona, podendo utilizar também componentes inorgânicos como o ácido casamino (LEITE et al., 2003).

A composição do meio pode ter uma estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, formato e qualidade do propágulo produzido, além da sua estabilidade após secagem e sua agressividade, medida em termos de virulência e patogenicidade. Portanto, no desenvolvimento de um meio de cultura, a primeira etapa é selecionar um meio definido ou semi definido que proporcione uma boa produção da forma desejada do fungo. A próxima etapa é variar os nutrientes e avaliar seu impacto na produção do patógeno, bem como na sua capacidade de suportar processos de secagem, estabilidade e virulência. Caso o meio desenvolvido tenha custo elevado, a última etapa seria substituir os componentes nutricionais por um substrato complexo, barato e acessível (JACKSON et al., 1996; JACKSON, 1997).

Conforme Leite et al. (2003), a diversidade de fontes de C e N tem sido bastante explorada no desenvolvimento de meios de cultura, especialmente de meios complexos a base de produtos naturais. Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que a proporção C:N é também um importante fator a ser considerado no desenvolvimento de meios de cultura, principalmente de meios líquidos que visam a produção de formas submersas.

Segundo Carlile & Watkinson (1994), um meio balanceado deverá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio. O primeiro é necessário como fonte de energia, enquanto que o segundo é essencial na síntese de componentes celulares, tais como ácidos nucleicos e quitina. Por sua vez, o fósforo é necessário na síntese de ácidos nucleicos e ATP.

Como fonte de carbono, avaliou-se a utilização das seguintes substâncias no crescimento e esporulação de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces marquandii*: glicose, sacarose, amido e lactose. Tanto no caso de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, o amido e a glicose mostraram melhores para o crescimento, sendo que o amido apresentou

melhor resultado para a esporulação. A glicose e sacarose obtiveram melhores resultados em ambos os casos para *P. marquandii* (MONTEIRO, 1988).

Os outros elementos (nitrogênio, fósforo e potássio) foram adicionados sob forma de tortas orgânicas, e proporcionaram aumento da massa micelial, do período de crescimento e da esporulação de *Verticillium lecanii* (NAGESH & REDDY, 1997).

Para incrementar o crescimento e a esporulação dos fungos, outros fatores podem ser acrescentados aos meios de cultivo. O extrato de levedura, excelente fonte de vitaminas e complexo B, foi adicionado ao meio de cultivo por Oliveira (2000), e causou incremento na produção de esporos do fungo *S. insectorum*. Também maior produção de conídios e porcentagem de germinação do fungo *Nomuraea rileyi* foram verificadas por Barros et al. (1988) ao se adicionar extrato de levedura.

O extrato de levedura também promoveu a mais elevada esporulação para o isolado Passo Fundo de *N. rileyi*, segundo Balardin e Loch (1989). Esse mesmo suplemento causou o maior crescimento de *B. bassiana* e também bons resultados para *M. anisopliae* na avaliação de alguns meios de cultivo durante a verificação do efeito de difenóis no crescimento de *Verticillium lecanii*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* feita por Hsiao et al. (1992). Nessa avaliação, apenas o meio suplementado com difenol apresentou crescimento melhor.

Vários trabalhos têm sido efetuados com o objetivo de se encontrar meios de cultura que favoreçam a esporulação, bem como reduzir o custo final do inseticida (VILAS BOAS, 1996), pois substratos adequados se fazem necessários para a produção em larga escala.

O arroz ainda é um dos substratos mais utilizados, mas alguns estudos têm sido feitos com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos (CRUZ et al., 1983), como o fubá de milho, farinha de arroz, soja, farelo de trigo, batata, sorgo, feijão, milho, arroz úmido, melaço, farinha de aveia, sais minerais, entre outros (CRUZ et al., 1983; NAHAS & ARAI, 1987; ALVARENGA et al., 1988; VERHAAR & HIJWEGEN, 1993; VILAS BOAS, 1996; OLIVEIRA, 2000).

Os seguintes meios de cultura naturais sólidos foram verificados por Wenzel (2002) na produção de *V. lecanii*: alpiste; arroz agulhinha e integral; farelo de arroz, soja e trigo; lentilha; lentilha moída; painço; quirela de arroz e milho; soja em grão e moída;

sorgo em grão e moído; e trigo em grão e moído. Os seguintes meios líquidos foram utilizados pelo mesmo autor: arroz agulhinha; batata; farelo de arroz, soja e trigo; feijão branco, carioca, guandú; fubá; lentilha; soja em grão, sorgo em grão e trigo em grão. A característica comum de todos esses substratos é a fácil obtenção e baixo custo, no Brasil, visando a produção em massa para utilização no campo.

No estudo de Vilas Boas (1996), para a produção de *M. anisopliae*, quatro substratos facilmente encontrados em larga escala foram utilizados, sendo comercializados rotineiramente na região de Pernambuco, como caupi (*Vigna unguiculata*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), fava (*Phaseolus lunatus* L.) e sorgo (*Sorgum bicolor* L.). O comportamento do mesmo fungo foi estudado por Bastos et al. (1976), utilizando-se diferentes meios: farinha de milho, farinha de arroz, farinha de trigo e a mistura destes amiláceos. O objetivo era obter um volume maior de esporos e também substituir os componentes do meio até então utilizados, por serem mais caros e algumas vezes difíceis de serem importados, como é o caso do ágar-ágar, reduzindo assim o custo de produção.

Também foi verificada a produção de *M. anisopliae* em diferentes meios de cultivo por alguns autores que utilizaram os seguintes substratos: lascas de mandioca misturadas com farelo de arroz (MOHAN & PILLAI, 1982), arroz brunido, arroz integral, quirelas de milho e de soja (CAMARGO, 1983) e água de côco (DANGAR et al., 1991).

O *M. anisopliae* é produzido e utilizado no Nordeste do Brasil desde 1969, visando o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar. Também em outras regiões do país este fungo é utilizado para o controle de cercopídeos das pastagens. Os processos mais comuns para a produção do *M. anisopliae* no Brasil são o da “garrafa de soro” e o do saco de polipropileno com meio de arroz sem casca mais água (GUAGLIUMI et al., 1974; MARQUES et al., 1981). Estes processos de produção são muito onerosos já que necessitam de grande número de pessoas para a manipulação dos materiais nas suas diferentes fases de desenvolvimento. Com relação a *B. bassiana*, podem ser utilizados os mesmos processos já referidos para *M. anisopliae*.

A produção de *B. bassiana* tem sido feita através da fermentação em líquido ou através do semi-sólido de arroz cozido. Em ambos os casos, consegue-se um bom volume de conídios, por um custo relativamente baixo, sendo que o micélio seco é a forma de produção mais comum recentemente (LEITE et al., 2003).

Mais suscetíveis às condições no campo, os entomopatógenos estão sujeitos a fatores bióticos e abióticos que influenciam na sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Entre os abióticos, a radiação solar (UV) é a mais importante (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001b; CAGAN & SVERCEL, 2001), pois pode inativar o conídio, provocar danos letais ao DNA e mutações (NICHOLSON et al., 2000). Em geral, os efeitos da radiação UV reduzem a eficiência do fungo no campo (BRAGA et al., 2001a).

Segundo Tuveson & McCoy (1982), Paul & Gwynn-Jones (2003) e Johnson (2003), a recuperação de DNA lesado pode ser iniciada através do fenômeno da fotorreativação, que juntamente com a esporulação de algumas espécies, pode ser induzida pelas radiações UV-A e UV-B, tornando-as benéficas nesses casos.

A temperatura é um dos fatores de grande importância e atua sobre os patógenos afetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo. Esse fator torna-se ainda mais importante tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura através de sistemas fisiológicos (ALVES, 1982).

2.4.1 Produção em meio semi-sólido

Devido ao elevado preço que o arroz vem alcançando no comércio, o custeio do substrato para o fungo tem acarretado despesas crescentes aos fabricantes, o que levou alguns pesquisadores a realizar sucessivos trabalhos de laboratório com o objetivo de averiguar a eficiência de outros produtos naturais que possam vir a substituí-lo. Segundo Guagliumi et al. (1974), diversos autores têm relatado o resultado de suas pesquisas, que sempre acabam por confirmar a superioridade do arroz como substrato sólido para o cultivo de *M. anisopliae*. Este sucesso se deve, grandemente, ao fato de que, quando se usam grãos inteiros de arroz para preparar o meio de cultura, formam-se interstícios que multiplicam notavelmente a superfície do meio, o que permite ao fungo penetrar totalmente na massa do

substrato. Esse detalhe não se verifica com a maioria dos meios de cultura, onde o *M. anisopliae* cresce, exclusivamente, na superfície exposta à oxigenação direta.

A superioridade do meio de arroz, em relação ao de amido e batata – dextrose no desenvolvimento e esporulação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* já foi comprovada por Marques & Vilas Boas (1973), Aquino (1974) e Valle et al. (1980). Moura-Costa & Magalhães (1974) e Villacorta (1978) utilizaram esse meio de cultivo para produção de conídios de *M. anisopliae*. Esse fungo é utilizado no controle biológico de cigarrinha da cana-de-açúcar e de pastagens em substituição aos inseticidas químicos. Para tal, há necessidade de produção em larga escala de conídios o que é feito em meio de arroz, especialmente arroz autoclavado em sacos de polipropileno ou frascos de vidro. Moura-Costa & Magalhães (1974), utilizaram também a farinha de arroz, obtida com auxílio de um moinho e posteriormente passada em peneira de malhas finas, verificando bom crescimento e esporulação em meio com concentração de 5% de farinha de arroz, 1% de ágar em pó e água destilada. Daoust & Roberts (1983) utilizando seis diferentes tipos de meios micológicos e três tipos de arroz concluíram que para produção de conídios o meio de arroz foi o que produziu resultados melhores e mais econômicos mesmo comparado aos meios micológicos complexos.

Aquino (1974) apresentou o meio sólido natural constituído por grãos autoclavados, como sendo o substrato mais indicado para o cultivo de *M. anisopliae* em grande quantidade.

Vários outros substratos naturais foram testados por Aquino (1974) e Guagliumi et al. (1974), comparados com o arroz, tais como, amido (goma de mandioca), fubá de milho, arroz em pó, arroz quebrado, farinha de mandioca, farelo de trigo, batata doce, batata inglesa, farelo de soja, torta de algodão, gérmen de trigo e gelose. Entre estes, a batata demonstrou ser excelente meio de cultura, com ótima esporulação, ainda que apenas na superfície do substrato. Porém, foi ela inferior ao meio de arroz inteiro cozido, que produziu grande quantidade de esporos, não só na superfície, como também, nos interstícios entre os grãos. O meio de arroz oferece, portanto, maior área de desenvolvimento ao fungo, havendo, conseqüentemente, formação de maior quantidade de esporos.

Camargo (1983) testou os seguintes cereais como meios de cultura para a produção de *M. anisopliae*: arroz brunido, arroz integral, quirera de milho de variedade Asteca, quirera de milho de variedade Nutrimais e quirera de soja, sendo a todos eles

acrescido 60% de água antes da autoclavagem. O autor concluiu que os meios de cultura com a utilização do arroz (brunido e integral) produziram quantidades significativamente superiores de esporos, quando relacionados com a produção nos outros meios estudados. A quirera de milho da variedade Asteca teve um rendimento de 31,8% inferior ao arroz brunido. Apesar desse menor rendimento do milho na produção de esporos, é possível que compense sua utilização face ao fato do mesmo ser mais barato que o arroz, porém há necessidade de maiores estudos a respeito.

Em Alagoas, de acordo com Mendonça & Rocha (1992), o arroz parboilizado é o único substrato utilizado, conseguindo-se 10^{10} conídios/g de arroz com o fungo. Fernandes et al. (1994) utilizaram combinações de arroz e milho triturados, farelo de arroz, bagacilho de cana-de-açúcar triturado e comparou-se ao arroz parboilizado, na produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Bals.) Vuill. Concluíram que o arroz triturado mais o bagacilho de cana foi superior aos outros meios utilizados para ambos os patógenos.

Um dos fatores observados, que favorece uma maior esporulação, é o que permite a penetração do micélio do patógeno e sua consequente esporulação no meio de cultura. Assim, Dorta et al. (1990), utilizando farinha de arroz, suplementou com 50% de casca de arroz e a produção de esporos de *M. anisopliae* dobrou.

Vilas Boas et al. (1996) estudando a diversificação de meios de cultura (arroz, caupi, fava, feijão e sorgo) para produção de fungos entomopatogênicos concluíram que para *B. bassiana* o arroz continua sendo o meio de cultura mais econômico e de maior produção de conídios. Já para *M. anisopliae* os resultados obtidos justificam diversificar o meio de cultura para sua produção, utilizando o caupi, pois o mesmo superou o arroz em 9% na produção de conídios. Não houve diferença significativa na mortalidade sobre *D. saccharalis*, quando o entomopatógeno foi produzido no caupi e no arroz. Mas, os autores concluem também que a vantagem na utilização do caupi é que pode ser alternado com o arroz, pois dependendo da oferta de grãos, o caupi tem seu preço inferior ao arroz em 30%.

Neves et al. (2001), testaram a produção de *B. bassiana* em seis diferentes tipos de arroz (quirera, tipo 2, extra, casca amarela, integral e parboilizado), utilizando várias quantidades de água e três métodos de preparo, e verificaram que quirera, integral e parboilizado foram os mais produtivos.

Costa & Magalhães (1974), testaram diversas composições de meio sólido, utilizando como substrato o arroz cozido, pó de arroz e ágar em diferentes concentrações, e concluíram que o melhor meio é composto por pó de arroz a 5%, ágar 1% e água destilada.

2.4.1.1 Produção de conídios

Os conídios podem ser produzidos em meios sólidos, semi-sólidos e líquidos, enquanto que as demais formas são geralmente produzidas em meios líquidos. A produção de conídios em meio sólido tem sido usada para a manutenção rotineira de isolados de produção em pequena escala visando estudos de laboratório, bem como para a produção em média e grande escala visando testes em campo e comercialização. O fungo é produzido na superfície de meio sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala comercial (LEITE et al., 2003).

Segundo Almeida & Batista Filho (2006), para a produção de conídios em larga escala, têm sido utilizados produtos vegetais de baixo custo, especialmente grãos de arroz. O arroz é inicialmente mergulhado em água previamente aquecida, dentro de uma vasilha, e pré-cozido por 15 minutos até obter a consistência emborrachada. Em seguida, o arroz pré-cozido é colocado dentro de frascos de vidro, sacos de polipropileno ou bandejas autoclaváveis e autoclavado por 30 minutos. Com o objetivo de fornecer espaço e oxigênio para o fungo crescer, o substrato deve ocupar no máximo a metade do volume do recipiente. Após o resfriamento, o meio é inoculado com conídios e, em seguida, incubado sob temperatura média de 25°C. O uso de sacos plásticos autoclaváveis é o método mais utilizado para a produção de *M. anisopliae*. Após 10 a 15 dias de incubação, os sacos são abertos e seu conteúdo exposto ao ar ou fluxo de ar levemente aquecido por 24 horas, até secar a umidade de 15% aproximadamente. O material então é embalado e armazenado sob refrigeração a 5°C por até três meses e até seis meses a -10°C.

Os meios deficientes em N, porém ricos em C, tendem a produzir maior quantidade de conídios (McCOY & KANAVAL, 1969; e ROMBACH et al., 1988). Assim, os meios usados na produção em massa de fungos são geralmente constituídos de produtos vegetais ricos em amido, como batata, arroz, aveia, milho, feijão dentre outros. Arroz cozido é um dos meios mais utilizados para a produção de fungos mitospóricos, principalmente nos países em desenvolvimento (JACKSON, 1997).

A conidiogênese de fungos é estimulada pela luminosidade. O fungo *B. bassiana* produziu mais conídios quando exposto a um regime de luz contínua (ALVES & MORAES, 1979), da mesma forma que *S. insectorum* (patógeno do percevejo-de-renda da seringueira) em estudos realizados pelo Instituto Biológico do Estado de São Paulo (LEITE et al., 2003). Já o fungo *M. anisopliae* apresentou maior produção sob fotoperíodo de 16 horas (ALVES, 1982). A conidiogênese de *M. anisopliae* foi estimulada pelas lâmpadas azul, amarela, vermelha e aquelas especiais para planta (ALVES et al., 1980).

Com relação à influência da temperatura, umidade, concentração de gás carbônico e luminosidade sobre a estabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. farinosus*, verificou-se que a viabilidade dos conídios foi reduzida pela exposição à luz e elevação de temperatura. Os conídios de *B. bassiana* e *P. farinosus* perderam a capacidade de germinação mais rapidamente nas umidades mais elevadas, enquanto que *M. anisopliae* sobreviveu durante mais tempo nas umidades extremas. Quando os conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. farinosus* foram mantidos no escuro a 8°C e 0% de umidade relativa, observou-se uma germinação próxima a 90% dos referidos fungos, após 28, 635 e 140 dias, respectivamente. *M. anisopliae* apresentou 92% de conídios germinados após 252 dias quando mantidos no escuro a 8°C e 75% de umidade relativa. A retirada de oxigênio eliminou o efeito desfavorável de umidades relativas intermediárias para a viabilidade de conídios de *M. anisopliae* (CLERK & MADELIN, 1965).

Ao trabalharem com os fungos *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa* no Japão, Kawakami & Mikuni (1965) verificaram a redução da longevidade dos esporos em função do aumento da temperatura e também uma maior viabilidade em baixa umidade relativa. Observaram ainda que a viabilidade dos esporos foi baixa com uma umidade relativa ao redor de 80%, ocorrendo um acentuamento desse comportamento em temperaturas elevadas. Após 50 dias a viabilidade dos conídios em meio de cultura foi 36,7% para *I.*

fumosorosea e 59,9% para *I. farinosa*, constatando-se que, aos 115 dias, os fungos tornaram-se inviáveis. Os autores apresentaram ainda as porcentagens de germinação dos fungos a 0, 10, 20 e 30°C, expostos a umidade relativa de 0 a 87%.

Os principais fatores ambientais que afetam a eficiência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* como agentes de controle biológico de *Hylobius pales* foram estudados por Walstad et al. (1970). Verificaram que a *B. bassiana* perdia a viabilidade dos conídios aos 15 dias quando submetido a temperatura de 21°C. *M. anisopliae* perdia a viabilidade aos 75 dias, sob os mesmos 21°C. Ambos permaneceram viáveis após 12 meses, quando armazenados a 8°C.

Zimmermann (1982) verificou correlação entre as condições de umidade presentes e a resistência dos conídios de *M. anisopliae* ao calor. Para a exposição de suspensão aquosa por 30 minutos, a temperatura média letal foi de 42°C. Conídios em pó submetidos às umidades de 100, 76 e 33% tiveram temperaturas médias letais de 50,5, 57 e 68,8°C, respectivamente. Foi constatado ainda que após 30 minutos de aquecimento da suspensão a 45°C, apenas 6,2% dos conídios germinaram com 24 horas de incubação. Decorridas 48 horas, a germinação totalizou 81,8% e, após esse período, não foi possível constatar outras determinações, uma vez que as placas estavam totalmente cobertas pelo fungo.

Segundo Abreu et al. (1983), temperaturas de 25 a 28°C propiciaram perdas na viabilidade de conídios de *M. anisopliae* aos 120 dias de armazenamento e redução da patogenicidade para *Galleria melonella*.

A viabilidade e atividade biológica de fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pela temperatura, umidade, substrato, radiação ultravioleta e outros fatores. A maioria dos trabalhos efetuados com os fungos *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *B. bassiana* (Bals.) Vuill. demonstra que com o aumento da temperatura e tempo de armazenamento, ocorre redução na viabilidade dos conídios, sendo em freezer (-13°C) a melhor condição para preservação (ABREU et al., 1983; BATISTA FILHO & CARDELLI, 1986; ALVES et al., 1987).

A estabilidade de fungos entomopatogênicos foi discutida por Roberts & Campbell (1977) em experimento efetuado com conídios puros de *M. anisopliae*. Quando colocados em tubos com ar, CO₂ e nitrogênio e armazenados nas temperaturas -20, 4 e 25°C,

verificou-se elevada viabilidade após 64 semanas em todos os gases a -20°C , no ar e nitrogênio a 4°C , enquanto que nos demais tratamentos a perda da viabilidade ocorreu com 16 semanas.

Marques & Alves (1996) trabalharam com armazenamento de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e verificaram que conídios puros de *B. bassiana* mantidos a 20°C durante 180 dias praticamente não mostraram redução na viabilidade, enquanto que *M. anisopliae* manteve apenas 63% de viabilidade naquele período. Estudando a preservação de formulações de *B. bassiana* durante sete anos, Alves et al. (1996) concluíram que, nas temperaturas de -10 a -7°C , foram mantidas a viabilidade e virulência do fungo sobre *D. saccharalis*.

O efeito de vários fatores do ambiente sobre o crescimento e sobrevivência dos fungos foi mencionado por Roberts & Campbell (1977). Apesar de prejudicial à sobrevivência dos conídios, o efeito sobre os demais estágios foi variável. A temperatura elevada produziu mortalidade no estágio vegetativo de fungos entomopatogênicos, mas os conídios foram mais resistentes ao calor. Entretanto, a viabilidade dos conídios foi perdida mais lentamente sob baixa temperatura.

Normalmente utiliza-se meio sólido para a produção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (com exceção da produção de *B. bassiana* em fermentação líquida na Rússia). Considerando que doenças ocasionadas por fungos geralmente ocorrem com atraso em relação ao ciclo da praga, a estratégia usada para o controle de insetos com esses organismos deveria ser através da antecipação da epizootia pela introdução de uma fonte de inóculo volumosa. A seleção de raças, através de manipulação genética provavelmente proporcionará importantes avanços no uso de fungos entomopatogênicos. Do mesmo modo, o desenvolvimento da produção e formulação terá um impacto significativo sobre a eficiência nesses agentes de controle de insetos (SOPER & WARD, 1981).

O aumento da temperatura e do tempo de armazenamento provocam retardamento na germinação dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (MARQUES, 1993).

2.4.2 Produção em meio líquido

Os meios líquidos têm sido cada vez mais utilizados para a produção de fungos em grande escala, pois permitem um melhor controle das condições físicas e nutricionais exigidas pelo organismo (JACKSON et al., 1996; JACKSON, 1997).

Na produção de blastosporos, corpos hifais e micélio têm sido avaliado como componentes de meio de cultura, além das fontes de C e N, também sais, componentes específicos e aditivos (LEITE et al., 2003).

Os meios ricos em C e, principalmente, N tendem a produzir maior quantidade de formas vegetativas: blastosporos, corpos hifais e micélio (McCOY & KANAVAL, 1969; ROMBACH et al., 1988).

Na produção de *B. bassiana* em meio líquido, a proporção C:N, representada pelos componentes sacarose:extrato de levedura, tem uma correlação direta com a produção de conídios submersos, e inversa com a de blastosporos. A proporção de 4:1 resulta em um aumento na produção de conídios enquanto que a máxima produção de blastosporos pode ser obtida na proporção de 1:1 (ROMBACH, 1989). Para outro isolado de *B. bassiana*, constatou-se que o N é um elemento essencial para a produção de blastosporos do fungo. Entretanto a adição de extrato de levedura reduz a produção dessa forma e estimula a formação de micélio (BIDOCHKA et al., 1987). O desbalanceamento nutricional de um meio, tornando-o menos complexo, também estimula a formação de micélio do fungo *N. rileyi* a partir de blastosporos (PENDLAND & BOUCIAS, 1997).

Segundo Leite et al. (2003), na produção de Entomophthorales, o excesso de nitrogênio em um meio de cultura pode inibir o crescimento do fungo devido ao acúmulo de metabólitos. O aumento da concentração de extrato de levedura acima de 1% no meio líquido inibe o crescimento do fungo *Batkoa* sp., patógeno da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, enquanto que o aumento da concentração total da mistura de extrato de levedura + extrato de carne + leite desnatado acima de 2% inibe o crescimento de *Furia* sp. patógeno das cigarrinhas das pastagens. Já o fungo *Neozygites floridana*, patógeno do ácaro-rajado, prefere concentrações mais elevadas de nitrogênio, com aumento na produção de corpos hifais em concentrações totais da mistura de extrato de carne + peptona + leite desnatado de até 4%.

A maioria dos hifomicetos produz blastosporos em cultivo submerso, entretanto, para otimizar a produção dessa forma, parâmetros específicos precisam ser ajustados para cada isolado estudado. Alguns isolados de *M. anisopliae* formam pequenas esferas (pellets) e produzem poucos blastosporos, enquanto outros isolados se reproduzem como micélio, formando também blastosporos. A produção de blastosporos de *M. anisopliae* foi aumentada, e a formação de pellets reduzida, através da redução da atividade da água do meio líquido, pela adição do polietileno PEG 200 ou de alta concentração de glicose (INCH & TRINCI, 1987; HUMPHREYS et al., 1989).

A redução da atividade da água do meio líquido tem sido avaliada procurando além de incrementar a produção do fungo, melhorar suas qualidades fisiológicas como a tolerância à dessecação (KLEESPIES & ZIMMERMANN, 1992). A produção de blastosporos de hifomicetos foi aumentada pela adição, no meio, de 5% de polietileno 200 (PEG 200) ou de uma concentração superior a 1,2% de Tween 80, bem como pelo ajuste da concentração de carbono e nitrogênio e de pH (KLEESPIES & ZIMMERMANN, 1992).

Tanzini (2002) avaliou dois meios de culturas para a produção dos fungos *B. bassiana* (1196), *M. anisopliae* (1189), *S. insectorum* (1229), *P. fumosoroseus* (1200) e *V. lecanii* (1200). Os meios líquidos testados foram a base de batata-dextrose-ágar (BDA) e meio de cultura completo (MC), utilizando frascos Erlenmeyer contendo 100 mL do meio, mantidos em agitação mecânica por um período de sete dias, a uma temperatura de $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Não houve diferença entre os meios líquidos. *B. bassiana* foi mais produtivo, com 10^9 conídios/mL, e os outros atingiram apenas 10^7 conídios/mL.

Segundo Cruz et al. (1983), a eficiência de alguns meios de cultura naturais líquidos com objetivo ao favorecimento da esporulação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, foi estudada em caldo de feijão, caldo de arroz, caldo de batata e água. Foram usados frascos de vidro com volume de 12 mL, que continham 3 mL de meio de cultura. Os resultados obtidos evidenciaram que o caldo de feijão foi o meio de cultura que mais favoreceu a esporulação, seguido do caldo de arroz. O aspecto da esporulação do fungo e a medida da concentração de esporos foram os critérios de leitura mais notórios para a caracterização da eficiência dos meios de cultura.

Uma cepa de fungo *Beauveria* sp., isolada de um exemplar de bicudo do algodoeiro (*A. grandis*), foi semeada em meios de cultura naturais líquidos, à base de arroz,

feijão e batata, com o objetivo de serem averiguadas a produção de esporos e a viabilidade. Os resultados evidenciaram a superioridade absoluta do caldo de feijão como indutor da produção de conídios. No estudo de viabilidade, a germinação dos esporos foi estatisticamente semelhante em arroz, feijão e batata (todos acima de 96%) (BATISTA FILHO et al., 1985).

Tanzini & Batista Filho (1992), produziram *P. fumosoroseus* (Wise) (Brawn & Smith) nos seguintes meios de culturas líquidos: feijão 20%; feijão 20% + sacarose 3%; extrato de levedura 1%; extrato de levedura 1% + sacarose 3%; leite de soja 10%; e leite de soja 10% + sacarose 3%, e verificaram que o melhor meio foi o macerado de feijão 20%, com 97% de viabilidade e $1,41 \times 10^8$ conídios/mL.

Pereira & Eira (1999) descreveram um meio líquido para produção de *M. anisopliae* à base de macerado de percevejo de *N. viridula* (Linnaeus, 1758) mais 0,2% de sacarose, a qual produz o dobro de conídios por grama de substrato a um custo de 51 vezes inferior, em relação ao processo convencional de produção em meio sólido.

O desenvolvimento e esporulação de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Hansfordia pulvinata* (Berkeley & MA Curtis) foram testados por Alvarenga et al. (1988), em meios de cultura líquidos obtidos por maceração de quatro variedades de feijão, de soja e de grão de bico, e verificaram que o feijão guandú é o melhor substrato para os três fungos.

Alguns meios líquidos naturais, como água de côco, extrato de abóbora e extrato de mamão, foram testados como alternativas por Ibrahim e Low (1993) para a produção de *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*.

Macerados de feijão de mesa (“carioquinha” e “jalo”), feijão guandú, soja e grão-de-bico foram testados como meio de cultivo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* por Alvarenga et al. (1988).

A produção do fungo entomopatogênico *S. insectorum* foi verificada por Oliveira (2000) nos seguintes meios líquidos: macerados de feijão de mesa, feijão guandú e soja, extratos de batata, fubá e soja, leite em pó, farelo de trigo e arroz.

As principais dificuldades do processo são obtenções de meios de cultura adequados que não afetem a virulência; determinações das condições de desenvolvimento e esporulação; e prevenção das contaminações secundárias. A grande vantagem desse processo é a obtenção de elevadas quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico e em pouco tempo (ALVES, 1998a).

2.4.2.1 Produção de blastosporos

Na produção de blastosporos é utilizado o processo de cultivo submerso em meio líquido, também conhecido por fermentação, realizado pela aeração constante do meio. A produção é otimizada pela seleção de isolados específicos e variação das condições de cultivo (LEITE et al., 2003).

O bioinseticida Boverin, que é comercializado na Rússia para controle de várias pragas, consiste de conídios ou blastosporos de *B. bassiana*. Na produção de blastosporos, o meio usado para obtenção do inóculo, em agitadores ou pequenos fermentadores, é o mesmo usado na fase final de produção, em grandes fermentadores (2 a 63 m³), sendo constituído de 2% de extrato de levedura, 1% de xarope de milho e sais minerais. Inicialmente o fungo é mantido no agitador por 42 horas, sob temperatura de 25 a 28°C, atingindo concentração de até 8,8 x 10⁸ blastosporos/mL. Em seguida, o fungo é inoculado no fermentador, utilizando um volume de inóculo de pelo menos 2% do volume de meio. A produção do fungo pode alcançar 15 a 20 kg de pasta de blastosporos/m³ de meio líquido, contendo 1,0 x 10⁹ a 1,5 x 10⁹ blastosporos viáveis/g de pasta (LEITE et al., 2003).

A colheita do fungo, na produção de Boverin, é feita por sedimentação dos blastosporos suspensos em uma solução de sulfato de alumínio ou por meio da sua filtração com uma bomba de vácuo, separando a pasta de blastosporos, seguido da secagem do fungo. Na secagem do fungo, a técnica de liofilização tem proporcionado melhores resultados, tendo sido a mais utilizada, inclusive para o produto Boverin. Na secagem do fungo mais inerte, expondo o mesmo a um fluxo de ar, recomenda-se que a redução da umidade na faixa crítica, entre 30 a 40%, seja obtida o mais rápido possível (FENG et al., 1994).

Na China, blastosporos de *B. bassiana* são colhidos por filtração. Para isso, o fungo suspenso no substrato líquido é previamente misturado com talco ou CaCO₃. O material obtido é formulado em grânulos de 1,2 a 1,4 mm usando-se um formulador de medicamentos. Os grânulos são expostos a um fluxo de ar com temperatura inferior a 30°C enquanto agitados, sendo a umidade conseqüentemente removida. O método de secagem em fluxo de ar é também usado para secar a pasta de blastosporos. Para isso, a pasta é exposta a

fluxo na pressão de 3kg/cm^2 , dentro de torre de secagem desenvolvida para esse fim. A temperatura é controlada para 35 a 40°C na saída do ar. O pó seco obtido contém 10^{10} blastosporos/g e uma umidade de 4,66% (FENG et al., 1994).

Em culturas submersas, além de menor produção de conídios, há a formação de blastosporos em vários fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana*, *B. brongniarti*, *M. anisopliae*, *Sorospora uvella* e *V. lecanii* (FERRON, 1978).

2.5 Fatores ambientais

A persistência de um entomopatógeno no habitat depende basicamente de três fatores: tipo de substrato em que o patógeno está localizado, fatores ambientais e forma do patógeno (presença ou não de estruturas de resistência, por exemplo, esporos, poliedros, etc.) (JAQUES, 1985).

A exposição aos fatores ambientais (temperatura, umidade, radiação solar, etc.) é determinante para a estabilidade dos entomopatógenos (IGNOFFO & BATZER, 1971; BROOME et al., 1974; JAQUES, 1985; GRIEGO et al., 1985; ALI & SIKOROWSKI, 1986).

2.5.1 Radiação ultravioleta

As radiações podem ser benéficas, malélicas ou inócuas para os fungos dependendo da qualidade e intensidade da radiação, tempo de exposição, etc. Quando as radiações não causam efeitos letais, normalmente influenciam o crescimento e a reprodução (VALLE, 1984).

Estudos em laboratório e campo sugerem que a luz solar, em especial a porção ultravioleta do espectro, é provavelmente o fator que mais afeta a persistência de

inseticidas microbianos, pois atua diretamente nos ácidos nucleicos, alterando-os ou mesmo destruindo-os, o que impede o crescimento e a multiplicação do microrganismo (VALLE, 1984).

A luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda entre 230 e 380 nm estimula a esporulação em alguns fungos (LEACH, 1965).

Em *M. anisopliae*, os estudos sobre efeitos da luz concentram-se em duas áreas: estímulo à esporulação e efeitos letais da luz UV (VALLE, 1984).

Bastos & Matta (1976) relatam que os melhores efeitos de produção de esporos são obtidos com alternância de período claro/ escuro, mas Santos (1978), Matta & Oliveira (1978) e Alves (1982) obtiveram maior produção de conídios com iluminação contínua.

Os efeitos letais causados por luz UV (253 nm) foram demonstrados por Corrêa (1983), Frigo (1983) e outros. Esses autores encontraram grande variabilidade entre isolados e sugerem sua utilização em programas de melhoramento visando obter linhagens mais resistentes.

As radiações solares também podem causar perda de viabilidade desse fungo. Corrêa (1983) demonstrou que a luz solar direta causa altas taxas de mortalidade, mas os conídios estão mais protegidos sob luz difusa e em solos mais porosos. Zimmermann (1982) estudando o efeito de lâmpadas artificiais com o mesmo espectro de ação da luz solar e com potência dez vezes maior, constatou que a luz diminui e retarda a germinação de conídios.

A radiação solar é considerada como o principal agente causador da inativação de entomopatógenos, especialmente na faixa ultravioleta (IGNOFFO & BATZER, 1971; BROOME et al., 1974; JAQUES, 1985; GRIEGO et al., 1985; ALI & SIKOROWSKI, 1986).

Um dos primeiros trabalhos sobre a inativação de fungos entomopatogênicos pelo ultravioleta foi o de Ignoffo et al. (1977), onde testou-se a estabilidade de vários tipos de patógenos. Estes autores determinaram que *N. rileyi* foi mais estável que entomopoxvirus, NPV, CPV e *V. necatrix*, com exceção do *Bacillus thuringiensis*.

Zimmermann (1982) estimou a meia-vida de *M. anisopliae* em condições de campo em 1 hora e 40 minutos quando se deixou o patógeno incubado por 24 horas e em 2 horas e 45 minutos para 48 horas de incubação.

Alves (1986c) determinou a DL₅₀ da luz ultravioleta germicida (253,7 nm) para vários isolados de *M. anisopliae*, sendo que esta varia de 32,01 a 68,18 segundos.

Além disso, algumas espécies de fungos têm mecanismos de proteção natural ao UV, porém, segundo Braga (2002a), a maioria desses microorganismos não possui proteção contra os efeitos deletérios da luz solar.

Para se medir os efeitos dos raios UV sobre os fungos entomopatogênicos estudados, pode-se utilizar lâmpada própria para radiação, com simulador de radiação solar (FARGUES et al., 1996) ou com radiação natural (ROTEM et al., 1985; SMITS et al., 1996).

O simulador solar permite que se exponham vários isolados em diferentes tempos de exposição, e permite ainda que se tenha uma exposição estável em todos os experimentos. As lâmpadas utilizadas no simulador solar reproduzem o espectro e intensidade próximos aos da luz solar (ROBERTS & FLINT, 2002).

Certas lâmpadas fluorescentes emitem raios UV-A, UV-B e estas podem ser usadas separadamente, em combinação ou ainda combinadas a outras lâmpadas que produzem alta intensidade de UV-A, UV-B e luz visível. O espectro dessas lâmpadas reproduz uma radiação semelhante à da luz solar ao meio-dia e, atualmente, são usadas em várias pesquisas com microorganismos (FARGUES et al., 1997).

O método menos utilizado é o da radiação natural, dada a sua alta variação ao longo do tempo, o que dificulta as pesquisas com microorganismos a respeito da tolerância ao UV e seus efeitos (ROBERTS & FLINT, 2002).

Alguns autores sugerem selecionar isolados mais tolerantes à radiação UV-B, pois sabe-se que a suscetibilidade dos fungos à radiação varia entre diferentes espécies e entre isolados (FARGUES et al., 1996). Diversos trabalhos têm sido realizados, em particular na França, Estados Unidos, Canadá, Eslováquia, Grécia e Brasil (FARGUES et al., 1996; INGLIS et al., 1997; FOURTOUNI, et al., 1998; CAGAN & SVERCEL, 2001; BRAGA et al., 2001a; BRAGA et al., 2002b), com objetivo de encontrar isolados tolerantes à radiação UV-B, ou seja, que mantenham a viabilidade e a virulência (CAGAN & SVERCEL,

2001; BRAGA et al., 2001c). No Brasil, há poucos trabalhos com este intuito. Hunt et al. (1994) e Braga et al. (2001b) encontraram isolados de fungos tolerantes, que apresentaram porcentagem de germinação em torno de 60%, após 2 horas de exposição.

Pesquisas com objetivo de avaliar os efeitos da radiação UV sobre a germinação e sobre a formação de colônias com isolados de *M. anisopliae* e *M. flavoviridae* têm sido realizadas em condições de laboratório com isolados cultivados em meio de cultura (HUNT et al., 1994; BRAGA et al., 2001abc). Também têm sido efetuadas pesquisas com estas duas espécies produzidas em meios de cultura e depois formuladas em óleo para verificar a resistência ao UV (MOORE et al., 1993). Também para as espécies *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*, os efeitos deletérios da exposição ao UV são claramente demonstrados, ocorrendo à redução na viabilidade e na virulência (INGLIS et al., 1995; FARGUES et al., 1996); resultados demonstram que 2 e 3 horas de exposição ao UV são suficientes para redução drástica da virulência de conídios de *M. anisopliae* em insetos de 3^o ínstar de *D. saccharalis* (FRANCISCO, 2004).

Franco (2005) estudando a tolerância de conídios às radiações UV-A e UV-B em função do tempo de cultivo de fungos entomogênicos concluiu que a tolerância varia com o tempo de cultivo e com a espécie utilizada. A tolerância dos conídios dos isolados JAB 12 de *P. fumosoroseus* e JAB 425 de *M. anisopliae* é incrementada à medida que se aumenta o tempo de cultivo. O inverso ocorre com o isolado JAB 10 de *A. aleyrodis*. Para o isolado IBCB 66 de *B. bassiana*, conídios muito jovens ou muito velhos são os menos tolerantes ao UV (FRANCO, 2005).

Além da composição dos meios de cultura, a luz tem mostrado grande influência sobre o crescimento e esporulação de muitos fungos (ALVES, 1982).

2.5.2 Temperatura

A maioria dos fungos mitospóricos é favorecida por temperaturas próximas de 25°C durante seu crescimento e conidiogênese, enquanto que os

Entomophthorales preferem temperaturas mais amenas, em torno de 20°C. Os mitospóricos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *N. 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, 1986a).

Para o *M. anisopliae* a temperatura ideal para germinação do esporo encontra-se na faixa de 25 a 30°C. Por outro lado, o limite de 24 a 30°C foi estabelecido por diversos autores como sendo a faixa ideal para o crescimento vegetativo e esporulação desse fungo (WALSTAD et al., 1970).

Estudando o efeito da temperatura e regime luminoso sobre o *M. anisopliae*, Bastos & Matta (1976) concluíram que a melhor temperatura para a esporulação foi de 25°C e o regime luminoso mais adequado foi o de luz alternada dia e noite. Os autores trabalharam com temperaturas variando de 5°C e os fotoperíodos luz contínua, escuro contínuo e luz alternada (dia e noite).

Villacorta (1978) trabalhando com diferentes isolados do *M. anisopliae* verificou que a 37°C houve inibição da germinação de conídios, tornando-os inviáveis quando os mesmos eram submetidos por mais de 96 horas a essa temperatura.

Santos (1978) estudando a influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *M. anisopliae*, verificou que a temperatura de 37°C inibe a germinação de conídios, tornando-os inviáveis se os mesmos forem expostos por mais de 96 horas nesta temperatura. Além disso a luz contínua tem influência sobre a produção de conídios aumentando-a bastante em relação à luz alternada e ao escuro total, sendo que este último favoreceu o desenvolvimento micelial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, localizado em Campinas, SP.

3.1 Isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Os isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) e *Beauveria bassiana* (IBCB 66), utilizados nos experimentos, provenientes da coleção de organismos entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu”, mantida no Laboratório de Controle Biológico, foram obtidos de uma amostra de solo de Iporanga/ SP e da broca-do-café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), respectivamente.

Os isolados encontram-se armazenados em “freezer” a -12°C, na forma de conídios puros, acondicionados em “ependorfs”.

3.2 Condição de esterilização

A vidraria utilizada foi esterilizada em estufa, na temperatura de 180°C, durante 3 horas. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos, com exceção dos meios sólidos que foram autoclavados durante 30 minutos.

3.3. Repicagem de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Para a realização dos bioensaios, os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram repicados em placas de Petri, de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de ágar-ágar e 20 g de dextrose em 1000 mL de água destilada).

Em câmara de fluxo laminar vertical previamente esterilizada com álcool 70%, cada fungo foi inoculado em três pontos nas placas através de uma alça de platina, previamente flambada.

As placas foram mantidas em câmaras para germinação (B.O.D.), a 25±1°C, UR 70±10% e fotofase de 12 horas. O período de incubação foi de 10 dias, e posteriormente armazenadas em geladeira (4°C) até a utilização nos experimentos.

Os conídios produzidos foram removidos da superfície do meio de cultura, com auxílio de espátula de metal, previamente flambada, para o preparo da suspensão em água estéril com espalhante adesivo (Tween 80[®] - 0,1mL/L), contendo 1 x 10⁸ conídios/mL.

As suspensões preparadas foram utilizadas para a produção semi-sólida e líquida de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

3.4 Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Foram realizadas 6 repetições para cada um dos 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).

As quantidades de substrato e água destilada utilizadas para o preparo dos meios naturais sólidos contidos na Tabela 1 foram baseadas no trabalho de Wenzel (2002).

A quantidade de substrato e água utilizada variou conforme a necessidade de se fazer uma mistura, com os diferentes tipos de substrato, que não ficasse nem muito seca e nem muito líquida para a produção dos fungos.

Os experimentos foram divididos em 3 partes, devido ao grande número de substratos. Após a análise estatística, foram selecionados os melhores substratos de cada uma das 3 partes.

Cada substrato foi distribuído em sacos de polipropileno, fechados com duas dobras, grampeado e autoclavado a 1 atm e 120°C, durante 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar vertical previamente esterilizada com álcool 70%, abriu-se uma parte do saco e foi inoculado 5 mL da suspensão, com o auxílio de uma pipeta, na concentração de 1×10^8 conídios/mL. Em seguida, o saco foi fechado, novamente, com grampo de metal. Os sacos foram agitados manualmente para homogeneização do inóculo e destorramento dos produtos.

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 horas (Figura 1). No quinto dia após a inoculação fez-se uma pequena abertura nos sacos, utilizando-se uma tesoura esterilizada, visando favorecer a esporulação do patógeno e a secagem do substrato, permanecendo por mais 4 dias nessa condição (Figura 2). Decorridos 9 dias, os sacos foram armazenados em “freezer” (-12°C).

Tabela 1. Quantidades de substrato e água destilada utilizadas para o preparo dos meios naturais semi-sólidos.

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



Figura 1. Substratos sólidos de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) em sacos de polipropileno mantidos “deitados” sobre prateleiras em sala climatizada.



Figura 2. Substratos sólidos de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) em sacos de polipropileno mantidos “em pé” após abertura.

3.4.1 Concentração de conídios

Para o exame da concentração dos conídios, foi retirado, ao acaso, uma amostra de 1 g do substrato com fungo de cada saco plástico, adicionando-se 10 ml de água estéril + espalhante adesivo (Tween 80[®]). Foram realizadas diluições em série (10^{-2})

para obtenção de uma suspensão que permitiu a contagem dos conídios em câmara de Neubauer sob microscópio (aumento de 400x).

3.4.2 Viabilidade de conídios

Após a quantificação dos conídios, fez-se os testes de viabilidade em placas plásticas contendo BDA, utilizando-se, com o auxílio de uma micropipeta e em câmara de fluxo laminar vertical previamente esterilizada com álcool 70%, 0,1 mL de cada tratamento/ placa.

3.4.2.1 Radiação ultravioleta

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 0, 25 e 50 segundos.

As placas foram incubadas por 15 horas em B.O.D. a 25°C.

Foram quantificados os números de conídios germinados e não germinados, dos quadrantes, em microscópio ótico com objetiva de 400x (ALVES, 1998c).

3.4.2.2 Temperatura

Para os ensaios de temperatura utilizou-se a mesma metodologia do item anterior, mas sendo cada tratamento exposto a diferentes temperaturas: 20, 25, 30 e 35°C.

As placas foram incubadas por 15 horas em B.O.D.

Foram quantificados os números de conídios germinados e não germinados, dos quadrantes, em microscópio ótico com objetiva de 400x (ALVES, 1998c).

3.4.3 Virulência à *Diatraea saccharalis*

Para os experimentos de virulência foram realizadas 8 repetições, contendo 10 lagartas para cada um dos 17 tratamentos, totalizando 80 lagartas por tratamento e 1360 lagartas para o experimento.

As lagartas de *D. saccharalis* de 3^o ínstar foram provenientes de criação artificial em dieta, mantidas na Usina São João, Araras, SP.

Cada lote de 10 lagartas de *D. saccharalis* foi colocado sobre uma placa de Petri de 12,0 cm de diâmetro para serem pulverizadas na torre de Potter. Os insetos foram pulverizados com 2 mL da suspensão de fungo, com concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL, de cada tratamento. As testemunhas foram pulverizadas com 2 mL de água estéril. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo a (0,01% de Tween 80[®]). Em seguida, as lagartas foram transferidas para potes de plástico transparente de 6,5 cm de altura x 5,0 cm de diâmetro, com tampa de rosca, permanecendo em jejum durante um período de 24 horas. Após este período, foi oferecido colmos de cana-de-açúcar de 3,0 cm de altura.

Cada inseto morto foi lavado em álcool 70% e água destilada, para desinfestação superficial. Em seguida, os insetos foram transferidos para placas plásticas de

4,5 cm de diâmetro, contendo algodão embebido em água para formar um ambiente úmido. As placas foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotofase de 12 horas e umidade relativa de $70\pm 10\%$. Por meio deste procedimento é que se obteve a confirmação da mortalidade causada pelo patógeno, observando-se o crescimento micelial e conidiogênese no cadáver (Figura 3).

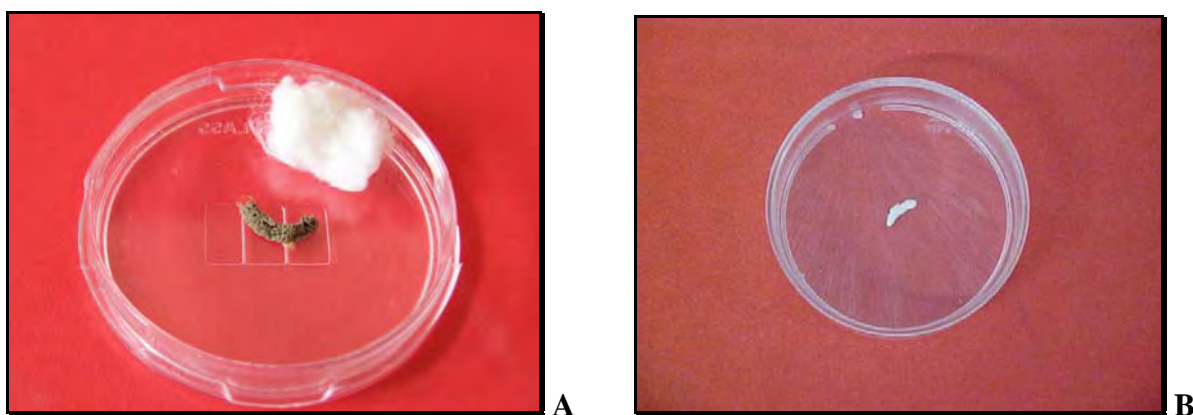


Figura 3. Lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis*, mortas e recobertas por micélio e conídios do fungo *M. anisopliae* (A) e *B. bassiana* (B).

Os dados foram coletados diariamente por um período de 10 dias, sendo avaliada a mortalidade (%) de lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis*.

3.5 Produção líquida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

3.5.1 Meio para produção de blastosporos

Foram avaliados 12 tratamentos, com 6 repetições cada, compostos pelas combinações entre as concentrações de Carbono (C) na forma de D-glicose anidra (40% de carbono) e sacarose (42,11% de carbono) com Nitrogênio (N) na forma de levedura de cerveja (7,31% de nitrogênio) por litro de meio. As proporções foram baseadas no trabalho de Sano (2005) (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Tabela 2. Quantidades de D-glicose anidra e levedura de cerveja para o preparo de 1,0 L de cada meio de cultura.

Tratamentos (40% C + 7,31% N)	Fonte de Carbono (C)		Fonte de Nitrogênio (N)	
	(g)		(g)	
	D-glicose anidra		Levedura de cerveja	
1	16,00 g C + 6,30 g N		40,00	86,13
2	16,00 g C + 7,00 g N		40,00	95,70
3	16,00 g C + 7,69 g N		40,00	105,27

Tabela 3. Quantidades de sacarose e levedura de cerveja para o preparo de 1,0 L de cada meio de cultura.

Tratamentos (42,11% C + 7,31% N)	Fonte de Carbono (C)		Fonte de Nitrogênio (N)	
	(g)		(g)	
	Sacarose		Levedura de cerveja	
4	20,00 g C + 6,30 g N		47,50	86,13
5	20,00 g C + 7,00 g N		47,50	95,70
6	20,00 g C + 7,69 g N		47,50	105,27

Tabela 4. Quantidades de D-glicose anidra e levedura de cerveja para o preparo de 1,0 L de cada meio de cultura.

Tratamentos (40% C + 7,31% N)	Fonte de Carbono (C)		Fonte de Nitrogênio (N)	
	(g)		(g)	
	D-glicose anidra		Levedura de cerveja	
7	14,40 g C + 7,00 g N		36,00	95,70
8	16,00 g C + 7,00 g N		40,00	95,70
9	17,60 g C + 7,00 g N		44,00	95,70

Tabela 5. Quantidades de sacarose e levedura de cerveja para o preparo de 1,0 L de cada meio de cultura.

Tratamentos (42,11% C + 7,31% N)	Fonte de Carbono (C)		Fonte de Nitrogênio (N)	
	(g)		(g)	
	Sacarose		Levedura de cerveja	
10	18,00 g C + 7,00 g N		42,75	95,70
11	20,00 g C + 7,00 g N		47,50	95,70
12	22,00 g C + 7,00 g N		52,25	95,70

Cada tratamento foi constituído de 6 Erlenmeyers com 100 mL de meio, vedados com tampão de algodão recobertos com papel alumínio e esterilizados em autoclave a 1 atm e 120°C, durante 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar vertical previamente esterilizada com álcool 70%, foi acrescentado em cada frasco, com auxílio de uma pipeta, 1 mL de suspensão na concentração de 1×10^8 conídios/mL. Em seguida, os frascos foram submetidos à agitação contínua em “shaker” marca Marconi, modelo MA 830, a 40 RPM, $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram por 4, 6 e 8 dias (Figura 4).

Os experimentos foram divididos em 2 partes, devido a capacidade do agitador em acomodar os Erlenmeyers. Após as análises estatísticas, foram selecionados os melhores meios de cada uma das 2 partes.



Figura 4. Vista superior de Erlenmeyers inoculados e dispostos em agitador.

3.5.2 Concentração de blastosporos

As quantificações de blastosporos foram realizadas com 4, 6 e 8 dias após a inoculação, retirando-se, em condições assépticas, uma amostra de 5 mL/ frasco para contagem de blastosporos. Dessa amostra, 1 mL foi adicionada a 9 mL de água estéril + espalhante adesivo (Tween 80[®]). Foram realizadas diluições em série (10^{-2}) para obtenção de uma suspensão que permitiu a contagem de blastosporos em câmara de Neubauer sob microscópio (aumento de 400x).

Para avaliação da qualidade do fungo com relação à presença de contaminantes, duas amostras de 0,1 mL de cada Erlenmeyer foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em câmaras para germinação (B.O.D.), a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $60\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, por um período de 7 dias. Os frascos que apresentaram contaminação foram descartados.

3.5.3 Contagem de colônias

3.5.3.1 Radiação ultravioleta

Após a quantificação dos blastosporos, o efeito da radiação ultravioleta sobre os propágulos foi avaliado em placas plásticas contendo BDA e pentabiótico (0,5 g/L), utilizando-se, com o auxílio de uma micropipeta em câmara de fluxo laminar vertical previamente esterilizada com álcool 70%, 100 µL de cada tratamento/ placa. Em seguida, 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 0, 25 e 50 segundos.

As placas foram incubadas em B.O.D. a 25°C durante 3 dias. Após esse período foram contadas as colônias de *M. anisopliae* e *B. bassiana* formadas nas placas (Figura 5).

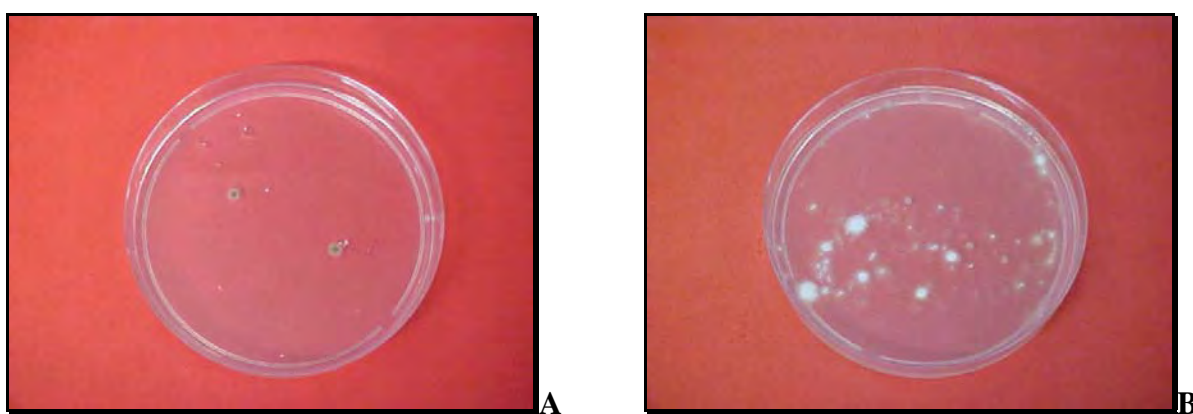


Figura 5. Exemplo de colônias de *M. anisopliae* (A) e *B. bassiana* (B) formadas em placas de Petri.

3.5.3.2 Temperatura

Para os ensaios de temperatura, utilizou-se a mesma metodologia do item anterior, mas sendo cada tratamento exposto a diferentes temperaturas: 20, 25, 30 e 35°C.

As placas foram incubadas em B.O.D. a 25°C durante 3 dias. Após esse período foram contadas as colônias de *M. anisopliae* e *B. bassiana* formadas nas placas (Figura 5).

3.5.4 Virulência à *Diatraea saccharalis*

Para os experimentos de virulência, foram utilizados 5 tratamentos com 8 repetições, contendo 10 lagartas, totalizando 80 lagartas por tratamento e 400 lagartas para o experimento.

A metodologia utilizada foi a mesma do item 3.4.3.

3.6 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, e a análise foi realizada através do programa ESTAT – Sistemas de Análises Estatísticas – desenvolvido na FCAV/ UNESP Câmpus de Jaboticabal, SP. As médias da produtividade de blastosporos foram submetidas à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Em algumas análises houve a necessidade de se fazer a transformação dos dados ($\sqrt{x+0,5}$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

4.1.1 Concentração de conídios

Levando-se em consideração as maiores concentrações de conídios, foram selecionados os seguintes substratos: arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído. Esses substratos foram selecionados para ambos os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Tabelas 6, 7 e 8). Entretanto, para *B. bassiana*, o arroz tipo 1 (testemunha) foi o substrato mais produtivo, por isso, a partir dele, selecionaram-se os melhores substratos. O arroz parboilizado tipo 1 não está entre os melhores produtores de conídios, mas como todos os outros substratos selecionados foram os mesmos para *M. anisopliae*, procurou-se avaliá-lo novamente.

Foram selecionados os melhores substratos de cada uma das três etapas. Alguns substratos como: aveia em flocos, farinha de mandioca crua, farinha de milho

amarela e fubá necessitaram, depois da autoclavagem, a sua descompactação. Portanto, eles exigiram maior mão-de-obra.

Tabela 6. Experimento 1: Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em substratos semi-sólidos (Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 h.).

Tratamentos	Concentração (x 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

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.

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 7. Experimento 2: Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em substratos semi-sólidos (Temperatura de 25±1°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 h.).

Tratamentos	Concentração (x 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	

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.

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 8. Experimento 3: Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em substratos semi-sólidos (Temperatura de 25±1°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 h.).

Tratamentos	Concentração (x 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 ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

* significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

Para *M. anisopliae* o trigo moído e o fubá de milho foram também superiores ao arroz, e apresentaram resultados equivalentes entre si (2,15, 2,04 e 1,91, respectivamente), constituindo boas opções para a produção deste fungo (Tabela 9).

Vilas Boas et al. (1996) cita diferença significativa quanto à concentração de conídios, em relação ao arroz, quando *M. anisopliae* foi produzido sobre fava e caupi e obtendo concentração bem superior. Por outro lado, o mesmo autor também cita que feijão e sorgo apresentaram performance inferior ao arroz.

Tabela 9. Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em substratos semi-sólidos (Temperatura de 25±1°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 h.).

Tratamentos	Concentração (x 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 (Testesmunha)	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 ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

* significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

No caso de *B. bassiana*, segundo Vilas Boas et al. (1996), o arroz constitui a melhor opção, do ponto de vista de produtividade, comparado à fava, feijão, sorgo e caupi. Pelos resultados observados na Tabela 9, o arroz parboilizado foi superior apenas à canjiquinha, tendo a esporulação de 1,41 x 10⁸ conídios/mL.

De acordo com Mendonça & Rocha (1992), o arroz parboilizado foi o único substrato utilizado, conseguindo-se 10¹⁰ conídios/g de arroz com o fungo. Fernandes et al. (1994) utilizaram combinações de arroz e milho triturados, farelo de arroz, bagacilho de cana-de-açúcar triturado e comparou-se ao arroz parboilizado, na produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Bals.) Vuill. Os autores concluíram que o arroz triturado mais o bagacilho de cana foi superior aos outros meios utilizados para ambos os patógenos.

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 e Vilas Boas (1973) haviam verificado 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.

Os resultados demonstraram que, para *M. anisopliae* o meio de arroz pode ser substituído pelo fubá e o trigo moído, pois os mesmos superaram o arroz tipo 1 em 6,80% e 12,56%, respectivamente, na produção de conídios. Entretanto, deve-se levar em consideração a relação custo/ benefício, já que ambos os substratos são mais caros que o arroz e a produção de conídios/mL não foi tão superior nesses substratos, a ponto de justificar a adoção de um deles em detrimento do arroz tipo 1. Conclui-se que o arroz ainda seja o substrato mais econômico e produtivo. O arroz tipo 2 apresentou a mesma concentração de conídios/mL do arroz tipo 1 e este é 12% mais barato que o arroz tipo 1, sendo uma ótima opção, em termos econômicos, para a substituição na produção de conídios de *M. anisopliae*. Já para *B. bassiana* o arroz parboilizado tipo 1 foi o meio de cultura mais econômico, mesmo ele sendo 12% mais caro que o arroz tipo 1. Com a sua maior produção de conídios, ele supera o arroz tipo 1 na relação custo/ benefício. O arroz tipo 2 é 21,55% mais produtivo que o arroz tipo 1 e 5,22% mais produtivo que o fubá, entretanto o fubá é 40% mais caro que o arroz tipo 1, não sendo uma boa opção de substituição.

O arroz ainda é um dos substratos mais utilizados, mas alguns estudos têm sido feitos com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos, como o fubá de milho, farinha de arroz, soja, farelo de trigo, batata, sorgo, feijão, milho, arroz úmido, melado, farinha de aveia, sais minerais, entre outros (CRUZ et al., 1983; NAHAS & ARAI, 1987; ALVARENGA et al., 1988; VERHAAR & HIJWEGEN, 1993; VILAS BOAS et al., 1996; OLIVEIRA, 2000).

Neves et al. (2001), testaram a produção de *B. bassiana* em seis diferentes tipos de arroz (quirera, tipo 2, extra, casca amarela, integral e parboilizado), utilizando várias quantidades de água e três métodos de preparo, e verificaram que quirera, integral e parboilizado foram os mais produtivos.

Quando comparamos a produtividade dos meios de cultura (Tabelas 6, 7, 8 e a Tabela 9), observamos menor produtividade nos resultados da Tabela 9 para *M. anisopliae*, com exceção do trigo moído e maior produtividade para *B. bassiana*, com exceção da canjiquinha. A diferença na produção de conídios no presente trabalho pode estar

relacionada, entre outras causas, com a dificuldade de se reproduzir, entre um experimento e outro, todas as condições disponíveis para o crescimento do fungo, tais como: teor de umidade do substrato, variação da temperatura da sala de incubação e nível de contaminação. Somando-se a essa diferença, são levados em conta, também, a técnica de produção, o intervalo da avaliação, variedades dos substratos, diferentes condições de armazenamento e vigor do isolado (ALVES, 1998a). Entretanto, estes resultados são importantes para a comparação da produção dos meios de cultura dentro do mesmo experimento.

4.1.2 Viabilidade de conídios

A escolha do substrato não influenciou na viabilidade de *M. anisopliae* ou de *B. bassiana*, porém, analisando-se 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 10), também de acordo com os estudos de Vilas Boas et al. (1996).

Entretanto, ressalta-se que os valores encontrados em todos os tratamentos foram superiores a 90% (Tabela 10), índice considerado ótimo para classificação do material.

Assim como no trabalho de Vilas Boas et al. (1996), não houve diferença significativa entre os tratamentos de *B. bassiana*.

Tabela 10. Viabilidade (%) de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em substratos semi-sólidos (Temperatura de 25±1°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 h.).

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.

4.1.2.1 Radiação ultravioleta

Analisando-se os efeitos da radiação ultravioleta sobre os conídios de *M. anisopliae*, nos substratos selecionados, observou-se que as maiores viabilidades ocorreram nos seguintes substratos, de acordo com o tempo de exposição à luz ultravioleta: 0 segundos – arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído; 25 segundos – arroz parboilizado tipo1, canjiquinha e farinha de milho amarela; 50 segundos – farinha de milho amarela (Tabela 11).

Por esses dados observou-se que houve diminuição gradativa da viabilidade de *M. anisopliae*, à medida que se aumentou o tempo de exposição à radiação ultravioleta (Tabela 11).

Tabela 11. Viabilidade (%) de *M. anisopliae* (IBCB 425) obtida em substratos semi-sólidos, com 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 (%)							
	0 segundos		25 segundos		50 segundos		Teste F	CV (%)
Arroz parboilizado tipo 1	94,67	C a ¹	52,33	AB b	5,17	BC c	206,65*	15,04
Arroz tipo 1 (Testemunha)	98,25	AB a	41,00	B b	4,17	C c	233,26*	15,91
Arroz tipo 2	97,33	AB a	18,50	C b	4,67	C c	1600,97*	7,62
Canjiquinha	96,00	BC a	61,33	A b	1,83	C c	3913,24*	3,51
Farinha de milho amarela	98,83	A a	53,33	AB b	23,67	A c	902,14*	5,27
Fubá	97,50	AB a	34,83	BC b	9,17	B c	84,27*	25,71
Trigo moído	99,08	A a	16,50	C b	2,67	C c	3429,19*	4,18
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 ao 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.

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 %. As radiações solares também podem causar perda de viabilidade do fungo, mas a cor amarela da farinha de milho conferiu uma maior proteção aos conídios sob luz direta. Segundo Braga (2002a), a maioria desses microorganismos não possui proteção contra os efeitos deletérios da luz solar. Sendo assim, a farinha de milho amarela pode ser utilizada para a produção de conídios visando a utilização no campo sob luz direta.

Mais suscetíveis às condições no campo, os entomopatógenos estão sujeitos a fatores bióticos e abióticos que influenciam na sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Entre os abióticos, a radiação solar UV é a mais importante (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001b; CAGAN & SVERCEL, 2001), pois pode inativar o conídio, provocar danos letais ao DNA e mutações (NICHOLSON et al., 2000). Em geral, os efeitos da radiação UV reduzem a eficiência do fungo no campo, ou seja, quando as radiações não causam efeitos letais, normalmente influenciam o crescimento e a reprodução (VALLE, 1984; BRAGA et al., 2001a). Alguns autores sugerem selecionar isolados mais tolerantes à radiação UV-B, pois sabe-se que a suscetibilidade dos fungos à radiação varia entre diferentes espécies e entre isolados (FARGUES et al., 1996).

Na análise feita com *B. bassiana*, as viabilidades observadas em função da radiação ultravioleta foram as seguintes: 0 segundos – não houve diferença significativa entre os tratamentos; 25 segundos – arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído; 50 segundos – canjiquinha e farinha de milho amarela (Tabela 12).

Os substratos arroz parboilizado tipo 1, canjiquinha, farinha de milho amarela e trigo moído, apresentaram queda de viabilidade aos 25 segundos, mas quando expostas à radiação ultravioleta por 50 segundos, as viabilidades permaneceram estáveis (Tabela 12). Novamente, a farinha de milho amarela se apresentou como um dos melhores substratos conferindo maior proteção (resistência) ao raio ultravioleta devido a maior quantidade de melanina.

No caso do arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2 e do fubá, observou-se queda de viabilidade entre 25 e 50 segundos (Tabela 12).

Tabela 12. Viabilidade (%) de *B. bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semi-sólidos, com 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 (%)				
	0 segundos	25 segundos	50 segundos	Teste F	CV (%)
Arroz parboilizado tipo 1	97,08 A	32,67 BC	31,67 BC	712,88*	6,39
Arroz tipo 1 (Testemunha)	95,42 A	42,00 A	30,17 C	653,07*	5,96
Arroz tipo 2	95,25 A	36,33 ABC	35,17 C	241,43*	9,74
Canjiquinha	96,83 A	42,83 ABC	37,50 AB	238,17*	8,82
Farinha de milho amarela	94,58 A	46,67 AB	38,33 AB	136,11*	10,65
Fubá	97,25 A	50,83 A	24,83 C	91,75*	16,28
Trigo moído	95,59 A	34,67 AB	34,50 BC	25,86*	11,10
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 ao 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.

Os efeitos letais causados por luz UV (253 nm) foram demonstrados por Corrêa (1983), Frigo (1983) e outros. Esses autores encontraram grande variabilidade entre isolados e sugerem sua utilização em programas de melhoramento visando obter linhagens mais resistentes.

4.1.2.2 Temperatura

Analisando-se o efeito das temperaturas sobre os conídios de *M. anisopliae* produzidos nos substratos selecionados, observou-se que as maiores viabilidades ocorreram nos seguintes substratos, de acordo com a temperatura aplicada: 20°C – arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído; 25°C – arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído; 30°C – arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1 (testemunha), canjiquinha, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído; 35°C – arroz parboilizado tipo 1, arroz tipo 1, arroz tipo 2, farinha de milho amarela, fubá e trigo moído. (Tabela 13).

No caso de *M. anisopliae*, o arroz tipo 1 (testemunha), farinha de milho amarela, fubá e o trigo moído são os mais versáteis, pois 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.

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. A canjiquinha foi o único tratamento a apresentar diminuição de viabilidade entre 30°C e 35°C (Tabela 13). Os resultados observados na temperatura de 20°C não têm diferença significativa dos resultados observados na temperatura de 30°C.

Tabela 13. Viabilidade (%) de *M. anisopliae* (IBCB 425) obtida em substratos semi-sólidos, com variação de temperatura.

Tratamentos	Temperatura					Teste F	CV (%)
	20°C	25°C	30°C	35°C			
Arroz parboilizado tipo 1	81,33 AB b ¹	94,67 C a	81,83 AB b	78,17 AB b	12,47*	6,02	
Arroz tipo 1	80,67 AB b	98,25 AB a	83,67 AB b	80,67 A b	59,63*	3,11	
Arroz tipo 2	80,00 AB b	97,33 AB a	77,33 B b	75,24 AB b	44,07*	4,13	
Canjiquinha	77,67 B b	96,00 BC a	79,00 AB b	71,17 B c	69,38*	3,85	
Farinha de milho amarela	86,00 A b	98,83 A a	84,17 A bc	80,67 A c	40,86*	3,47	
Fubá	82,67 AB b	97,50 AB a	81,50 AB b	80,17 A b	41,99*	3,58	
Trigo moído	82,17 AB b	99,08 A a	84,33 A b	84,33 A b	26,26*	4,26	
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 ao 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.

Estudando o efeito da temperatura e regime luminoso sobre o *M. anisopliae*, Bastos & Matta (1976) concluíram que a melhor temperatura para a esporulação foi de 25°C e o regime luminoso mais adequado foi o de luz alternada dia e noite. Os autores trabalharam com temperaturas variando de 5°C e os fotoperíodos luz contínua, escuro contínuo e luz alternada (dia e noite). Os resultados obtidos por este trabalho estão de acordo com a conclusão de Bastos & Matta (1976), pois foi mostrado que os melhores resultados foram obtidos à temperatura de 25°C (Tabela 13). Alguns autores citam a faixa favorável de 24 a 30°C para a esporulação de *M. anisopliae* (ROBERTS & CAMPBELL, 1977), porém, raramente fazem referências às linhagens de fungo com os quais trabalharam.

Villacorta (1978) trabalhando com diferentes isolados do *M. anisopliae*, e Santos (1978) estudando a influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *M. anisopliae*, verificaram que a 37°C houve inibição da germinação de conídios tornando-os inviáveis quando os mesmos 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 ótima, comprovando o declínio de viabilidade a partir dos 30°C.

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 (Tabela 14).

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 a viabilidade obtida com estes, aos 20 e 30°C (Tabela 14).

Pode-se concluir que os conídios de *B. bassiana* são bastante sensíveis à temperaturas acima de 30°C ocorrendo menor taxa de viabilidade a partir dessa temperatura.

Tabela 14. Viabilidade (%) de *B. bassiana* (IBCB 66) obtida em substratos semi-sólidos, com variação de temperatura.

Tratamento	Temperatura					Teste F	CV (%)
	20°C	25°C	30°C	35°C	35°C		
Arroz parboilizado tipo 1	72,17	97,08	72,33	25,67	AB c	149,45*	8,94
Arroz tipo 1 (Testemunha)	75,00	95,42	85,50	20,67	AB d	647,25*	4,65
Arroz tipo 2	67,50	95,25	79,17	24,67	AB d	773,75*	3,99
Canjiquinha	85,67	96,83	82,00	29,67	A c	241,17*	6,42
Farinha de milho amarela	79,50	94,58	80,33	16,00	B c	231,07*	8,36
Fubá	82,00	97,25	81,33	19,00	B c	579,23*	5,06
Trigo moído	72,50	95,50	77,67	20,50	AB c	80,08*	13,26
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 ao 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.

Segundo Walstad et al. (1970), os conídios de *B. bassiana* apresentam uma faixa suportável de temperatura, para germinação, entre 15°C e 35 °C; e para esporulação, entre 10°C e 35°C. No presente trabalho, não observaram-se efeitos das temperaturas entre 20°C e 30°C, sendo que os resultados obtidos à temperatura de 35°C foram considerados baixos, com viabilidade abaixo de 30%.

Os fungos mitospóricos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *N. 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, 1986a). Para *M. anisopliae* a temperatura ideal para germinação do esporo encontra-se na faixa de 25 a 30°C. Além disso, o limite de 24 a 30°C foi estabelecido por diversos autores como sendo a faixa ideal para o crescimento vegetativo e esporulação desse fungo (WALSTAD et al., 1970).

4.1.3 Virulência à *Diatraea saccharalis*

Pela mortalidade confirmada (que representa o número de insetos nos quais se observou a extrusão e reprodução do patógeno, em lagartas infectadas por *M. anisopliae*), utilizando suspensões dos substratos selecionados na concentração de 1×10^7 conídios/mL, observou-se que a maior virulência ocorreu no arroz parboilizado, arroz tipo 1 (testemunha), arroz tipo 2, canjiquinha, fubá e trigo moído, sendo que mortalidade confirmada foi igual ou superior a 85,00%. A farinha de milho amarela também apresentou 75,00% de mortalidade confirmada (Tabela 15).

No caso de *B. bassiana* não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que em todos os tratamentos, apresentaram maior virulência do que *M. anisopliae*, variando entre 93,75% a 100,00% (trigo moído) de mortalidade confirmada.

Esta capacidade do fungo produzir propágulos do patógeno é um aspecto importante e que pode levar ao desencadeamento de epizootias em campo, uma vez que, em condições ambientais favoráveis, mantém ou aumenta o potencial de inóculo em uma determinada área (LECUONA & ALVES, 1988).

Macedo et al. (1990) observou que *B. bassiana* provocou, com a mesma dosagem, mortalidade entre 38,00 e 80,00% quando inoculado em *D. saccharalis*, enquanto que *M. anisopliae* provocou mortalidade entre 18,00 e 50,00%, quando inoculado na mesma praga-alvo. No presente trabalho a mortalidade confirmada para *B. bassiana* foi entre 90,00 e 100,00% e *M. anisopliae* apresentou mortalidade entre 75,00 e 95,00%.

Tabela 15. Mortalidade confirmada (%) em lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis* em função das diferentes suspensões de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, obtidas em meios de cultura semi-sólidos (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 ao nível de 5% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

4.2 Produção em meio líquido de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

4.2.1 Concentração de blastosporos

Para a seleção dos meios fez-se a somatória da produção de blastosporos ($\times 10^8/\text{mL}$) nos 3 dias de avaliação. Sendo assim, foram escolhidos os 2 meios de cultura mais produtivos de cada uma das etapas (Tabelas 16, 17, 18 e 19).

Tabela 16. Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) obtida em meio de cultura líquido com diferentes teores de N e C, 4, 6 e 8 dias após a inoculação (Temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h.).

Tratamentos (g)	Concentração média ($\times 10^8$ blastosporos/mL)					
	4º dia	6º dia	8º dia	Σ (3 dias)	Teste F	CV (%)
1 16,00 C + 6,30 N	1,16 A a ¹	1,18 A a	1,31 A a	3,65	2,40 ^{ns}	13,42
2 16,00 C + 7,00 N	1,21 A b	1,22 A b	1,48 A a	3,91	9,45*	11,75
3 16,00 C + 7,69 N	1,11 A b	1,19 A ab	1,29 A a	3,59	6,54*	10,21
4 20,00 C + 6,30 N	1,19 A a	1,15 A ab	1,01 B b	3,35	5,65*	8,65
5 20,00 C + 7,00 N	1,21 A a	1,16 A a	1,05 B a	3,42	1,90 ^{ns}	22,80
6 20,00 C + 7,69 N	1,22 A a	1,13 A ab	1,00 B b	3,35	7,50*	8,67
Teste F	0,83 ^{ns}	0,96 ^{ns}	14,49*	-	-	-
CV (%)	10,04	18,27	10,70	-	-	-
Erro padrão da média	0,0485	0,0886	0,0520	-	-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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 17. Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) obtida em meio de cultura líquido com diferentes teores de N e C, 4, 6 e 8 dias após a inoculação (Temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h.).

Tratamentos (g)	Concentração média ($\times 10^8$ blastosporos/mL)					
	4 ^o dia	6 ^o dia	8 ^o dia	Σ (3 dias)	Teste F	CV (%)
7 14,40 C + 7,00 N	1,58 A a ¹	1,55 A a	1,49 A a	4,62	0,36 ^{ns}	12,50
8 16,00 C + 7,00 N	1,30 A a	1,37 A a	1,51 A a	4,18	1,57 ^{ns}	15,13
9 17,60 C + 7,00 N	1,44 A a	1,51 A a	1,55 A a	4,50	0,20 ^{ns}	20,47
10 18,00 C + 7,00 N	1,31 A b	1,45 A ab	1,55 A a	4,31	4,03*	10,18
11 20,00 C + 7,00 N	1,42 A a	1,44 A a	1,54 A a	4,40	1,03 ^{ns}	10,11
12 22,00 C + 7,00 N	1,44 A a	1,41 A a	1,38 A a	4,23	0,12 ^{ns}	14,37
Teste F	0,74 ^{ns}	0,89 ^{ns}	1,36 ^{ns}	-	-	-
CV (%)	18,86	9,96	12,86	-	-	-
Erro padrão da média	0,1112	0,0611	0,0752	-	-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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 18. Concentração média de *B. bassiana* (IBCB 66) obtida em meio de cultura líquido com diferentes teores de N e C, 4, 6 e 8 dias após a inoculação (Temperatura de 26±1°C e fotofase de 12 h.).

Tratamentos (g)	Concentração média (x 10 ⁸ blastosporos/mL)					
	4 ^o dia	6 ^o dia	8 ^o dia	Σ (3 dias)	Teste F	CV (%)
1 16,00 C + 6,30 N	1,44 A a ¹	1,00 B b	0,87 C b	3,31	25,47*	12,11
2 16,00 C + 7,00 N	1,29 A a	0,98 B b	0,81 C c	3,08	26,21*	11,74
3 16,00 C + 7,69 N	1,24 A a	1,04 B b	0,89 C c	3,17	15,46*	11,15
4 20,00 C + 6,30 N	1,36 A a	1,43 A a	1,74 A a	4,53	1,56 ^{ns}	26,24
5 20,00 C + 7,00 N	1,13 A b	1,16 BC b	1,52 A a	3,81	8,99*	13,31
6 20,00 C + 7,69 N	1,20 A b	1,48 A a	1,48 AB a	4,16	6,46*	9,92
Teste F	1,99 ^{ns}	20,30*	12,86*	-	-	-
CV (%)	14,58	11,30	22,06	-	-	-
Erro padrão da média	0,0763	0,0573	0,1057	-	-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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 19. Concentração média de *B. bassiana* (IBCB 66) obtida em meio de cultura líquido com diferentes teores de N e C, 4, 6 e 8 dias após a inoculação (Temperatura de 26±1°C e fotofase de 12 h.).

Tratamentos (g)	Concentração média (x 10 ⁸ blastosporos/mL)					
	4 ^o dia	6 ^o dia	8 ^o dia	∑ (3 dias)	Teste F	CV (%)
7 14,40 C + 7,00 N	1,18 A a ¹	1,19 A a	1,21 AB a	3,58	0,22 ^{ns}	12,67
8 16,00 C + 7,00 N	1,23 A a	1,29 A a	1,16 B a	3,68	0,22 ^{ns}	13,51
9 17,60 C + 7,00 N	1,17 A a	1,22 A a	1,22 AB a	3,61	0,19 ^{ns}	12,15
10 18,00 C + 7,00 N	1,21 A a	1,24 A a	1,25 AB a	3,70	0,48 ^{ns}	7,64
11 20,00 C + 7,00 N	1,18 A b	1,30 A ab	1,46 A a	3,94	9,67*	8,56
12 22,00 C + 7,00 N	1,12 A b	1,13 A a	1,13 B b	3,38	11,82*	7,82
Teste F	0,91 ^{ns}	2,08 ^{ns}	3,30*	-	-	-
CV (%)	9,08	10,32	13,10	-	-	-
Erro padrão da média	0,0440	0,0531	0,0657	-	-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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.

Foram selecionados os melhores meios de cada uma das duas etapas para *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Tabela 20). Para *M. anisopliae* os melhores meios de cultura foram aqueles que apresentaram D-glicose anidra (fonte de C) em sua composição e para *B. bassiana* os tratamentos que continham sacarose (fonte de C).

Verificou-se, que no 4^o, 6^o e 8^o dias de avaliação da concentração de blastosporos de *M. anisopliae*, não houve diferença significativa entre os dois tratamentos e entre os dias de avaliação (Tabela 20). Nota-se que ambos os tratamentos possuem 10% a mais e 10% a menos de D-glicose anidra e a mesma quantidade de levedura de cerveja.

Tabela 20. Concentração média de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em meios de cultura líquidos com diferentes teores de N e C, 4, 6 e 8 dias após a inoculação (Temperatura de 26±1°C e fotofase de 12 h.).

Tratamentos (g)	Concentração média (x 10 ⁸ blastosporos/mL)									
	<i>M. anisopliae</i>					<i>B. bassiana</i>				
	4 ^o dia	6 ^o dia	8 ^o dia	Teste F	CV (%)	4 ^o dia	6 ^o dia	8 ^o dia	Teste F	CV (%)
2 16,00 C + 7,00 N	1,45 A a ¹	1,47 A a	1,50 A a	0,67 ^{ns}	10,31	-	-	-	-	-
7 14,40 C + 7,00 N	1,54 A a	1,43 A a	1,38 A a	1,31 ^{ns}	12,88	-	-	-	-	-
4 20,00 C + 6,30 N	-	-	-	-	-	1,34 B a	1,57 A a	1,59 A a	3,57 ^{ns}	12,08
11 20,00 C + 7,00 N	-	-	-	-	-	1,56 A a	1,59 A a	1,60 A a	0,54 ^{ns}	9,97
Teste F	0,72 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-	-	9,09*	0,04 ^{ns}	0,62 ^{ns}	-	-
CV (%)	10,25	14,32	9,34	-	-	8,98	10,62	12,94	-	-
Erro padrão da média	0,0631	0,0882	0,0575	-	-	0,0566	0,0670	0,0816	-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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.

Em relação à produtividade de *B. bassiana*, o tratamento 11 (20,00 g C + 7,00 g N) foi o que apresentou maior quantidade de blastosporos na avaliação do 4^o dia. Não houve diferença significativa entre as avaliações do 6^o e 8^o dias e entre os dias de avaliação (Tabela 20). Assim sendo, observou-se que produtividade ficou distribuída ao longo da análise, exceto para o 4^o dia, que destacou-se dos demais.

Nota-se que ambos os tratamentos selecionados para *B. bassiana* apresentam a mesma quantidade de sacarose e 10% a mais e 10% a menos de levedura de cerveja.

Sano (2005) comenta que os meios de cultura líquidos com baixas quantidades de extrato de levedura apresentam menor custo de produção, pois o nitrogênio é mais caro que o carbono. O mesmo autor sugere que o custo dos componentes dos meios de cultura poderia ser diminuído com pesquisas para se determinar produtos mais baratos que possam substituir a D-glicose anidra e extrato de levedura, sem diminuir a concentração.

Tendo-se em vista o fato de que os meios líquidos selecionados para *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentam em sua composição maior quantidade (em gramas) de nitrogênio, o presente trabalho utilizou levedura de cerveja como fonte de N, sendo que Sano (2005) utilizou extrato de levedura. Do ponto de vista econômico, o primeiro é mais vantajoso que o último, apresentando-se como alternativa viável de fonte de nitrogênio.

Também observou-se que os melhores meios para a produção de blastosporos são constituídos por menor concentração de nitrogênio e maior concentração de carbono. Esse fato também foi observado por Oliveira (2000) e Sano (2005), que acrescentaram diferentes concentrações de extrato de levedura aos meios líquidos para produção de *S. insectorum*, e *M. anisopliae*, respectivamente, e obtiveram as melhores produtividades com as menores concentrações de nitrogênio.

Apesar de existirem algumas dificuldades práticas para a produção de fungos em meios líquidos, esse método tem grandes vantagens no que se refere à facilidade de aplicação em condições de campo, pois o produto já se encontra pronto para ser colocado no pulverizador a ser utilizado, evitando-se com isso os gastos com mão-de-obra para a lavagem do material como é feito quando produzido em meio sólido de arroz. Porém, o fungo produzido nos substratos sólidos mostrou-se mais virulentos (acima de 70,00%) quando comparados com os meios líquidos (abaixo de 30,00%).

4.2.2 Contagem de colônias

4.2.2.1 Radiação ultravioleta

Observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos para *M. anisopliae* e entre os tratamentos de *B. bassiana* (Tabela 21). Porém, observou-se que quanto maior o tempo de exposição à radiação UV, menor o número de colônias presentes, sendo que após 50 segundos de exposição, o número de colônias foi muito baixa.

Esses resultados concordam com as observações presentes em vários trabalhos relacionados a influência da radiação UV sobre esporulação (LEACH, 1965), germinação (ZIMMERMAN, 1982), viabilidade (CORRÊA, 1983) e inativação de entomopatógenos (IGNOFFO & BATZER, 1971; BROOME et al., 1974; JAQUES, 1985; GRIEGO et al., 1985; ALI & SIKOROWSKI, 1986).

Tabela 21. Números de colônias obtidas após incubação de blastosporos de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) após 0, 25 e 50 segundos sob radiação ultravioleta. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h.

Tratamentos (g)	Número de colônias (0,1 mL/ placa de Petri)									
	<i>M. anisopliae</i>					<i>B. bassiana</i>				
	0s	25s	50s	Teste F	CV (%)	0s	25s	50s	Teste F	CV (%)
2 16,00 C + 7,00 N	11,13 A a ¹	6,27 A b	1,11 A c	358,30*	10,49	-	-	-	-	-
7 14,40 C + 7,00 N	10,64 A a	6,39 A b	1,31 A c	151,74*	15,18	-	-	-	-	-
4 20,00 C + 6,30 N	-	-	-	-	-	10,55 A a	5,36 A b	1,95 A c	295,54*	10,36
11 20,00 C + 7,00 N	-	-	-	-	-	10,89 A a	6,13 A b	1,83 A c	235,77*	11,51
Teste F	1,14 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,83 ^{ns}	-	-	0,47 ^{ns}	4,36 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-	-
CV (%)	7,33	17,06	29,51	-	-	8,02	11,04	24,48	-	-
Erro padrão da média	0,3259	0,4410	0,1505	-	-	0,3510	0,2591	0,1888	-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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.

4.2.2.2 Temperatura

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para *M. anisopliae*, indicando que, entre os meios testados, não há nenhum que apresente melhor desempenho em função da temperatura. (Tabela 22). Conclui-se que não há efeito dos meios de cultura a temperaturas extremas.

Segundo (ALVES, 1986a), o *M. anisopliae* e *B. bassiana*, apresentam faixas de temperaturas favoráveis para o desenvolvimento de 24 a 30°C e 22 a 26°C, respectivamente, enquanto que Walstad et al (1970) estabeleceu que o limite de 24 a 30°C é o melhor para germinação do esporo do *M. anisopliae*. Bastos e Matta (1976) concluíram que a melhor temperatura de esporulação de *M. anisopliae* foi de 25°C.

As Tabelas 22 e 23 resumizam os números de colônias obtidas após incubação a 20, 25, 30 e 35°C. Pode-se verificar que a 25 e 30°C o fungo germinou muito bem, obtendo-se o número esperado de colônias. Entretanto, à temperatura de 20°C o crescimento das colônias foi sensivelmente menor que o crescimento observado à 25 e 30°C.

À temperatura de 35°C o crescimento foi praticamente nulo.

Resultados semelhantes também foram observados por Santos (1978), onde o número de colônias obtidas após incubação de conídios de *M. anisopliae* à 28°C foi de 98 colônias. O mesmo autor enfatiza que a temperatura de 37°C inibe a germinação dos conídios, não tendo sido verificado crescimento algum nas placas mantidas a essa temperatura.

Entre os tratamentos de *B. bassiana*, o tratamento 20,00 g C + 6,30 g N apresentou diferença significativa em relação ao tratamento 20,00 g C + 7,00 g N, comparando-se o número de colônias a 35°C. Porém, essa variação não se mostrou consistente ao longo das temperaturas, indicando que se trata apenas de uma variação ocasional.

Para *M. anisopliae*, a melhor faixa para crescimento de colônias foi entre 25°C e 30°C, enquanto que para *B. bassiana*, a temperatura ótima foi de 25°C.

Tabela 22. Número de colônias de *M. anisopliae* (IBCB 425) obtidas em meios de cultura líquidos, com variação de temperaturas.

Tratamentos (g)	Temperatura					Teste F	CV (%)
	20°C	25°C	30°C	35°C			
2 16,00 C + 7,00 N	8,87 A b ¹	11,13 A a	10,19 A a	0,88 A c	237,87*	9,58	
7 14,40 C + 7,00 N	8,57 A b	10,64 A a	10,08 A a	0,79 A c	367,82*	7,76	
Teste F	0,67 ^{ns}	1,14 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-	-	
CV (%)	7,26	7,33	8,21	28,80	-	-	
Erro padrão da média	0,2584	0,3259	0,3397	0,0984	-	-	

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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 23. Número de colônias de *B. bassiana* (IBCB 66) obtidas em meios de cultura líquidos, com variação de temperaturas.

Tratamentos (g)	Temperatura					Teste F	CV (%)
	20°C	25°C	30°C	35°C			
4 20,00 C + 6,30 N	8,11 A b ¹	10,55 A a	8,90 A b	0,97 A c		245,26*	9,53
11 20,00 C + 7,00 N	7,93 A c	10,89 A a	9,69 A b	0,71 B d		250,16*	9,67
Teste F	0,14 ^{ns}	0,47 ^{ns}	4,09 ^{ns}	5,00*		-	-
CV (%)	10,42	8,02	7,23	23,97		-	-
Erro padrão da média	0,3413	0,3510	0,2741	0,4851		-	-

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

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

* significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

^{ns} não significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

CV = Coeficiente de variação.

4.2.3 Virulência à *Diatraea saccharalis*

Analisando-se a mortalidade confirmada de lagartas infectadas por *M. anisopliae*, utilizando-se suspensões dos meios selecionados na concentração de 1×10^7 blastosporos/mL, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 24).

No caso de *B. bassiana*, também não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 24).

Segundo Sano (2005), quanto à patogenicidade, os blastosporos foram tão eficientes quanto os conídios, quando inoculados em *M. fimbriolata*. Porém, os resultados do presente trabalho mostram que, para *D. saccharalis*, os blastosporos apresentaram virulência entre 26,00 e 29,00%, tanto para *M. anisopliae* quanto para *B. bassiana* em todos os meios avaliados, enquanto que os conídios apresentaram virulência superior a 90,00% em todos os substratos testados, tanto para *M. anisopliae* quanto para *B. bassiana*. Os blastosporos possuem baixa resistência no ambiente porque a parede celular possui a mesma constituição da parede da hifa, e são produzidos submersos no meio de cultura o que facilita o processo de produção, antecipa o tempo de colheita, além de permitir um aumento na quantidade de unidades infectivas produzidas por volume de meio. Assim, a maior produção desse propágulo pode compensar a sua menor patogenicidade.

Tabela 24. Mortalidade confirmada (%) em lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis* em função das diferentes suspensões de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, obtidas em meios de cultura líquidos (blastosporos), com diferentes teores de N e C, 8 dias após a inoculação (Temperatura de 26±1°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 h.).

Tratamentos (g)		Mortalidade Confirmada (%)	
		<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
2	16,00 C + 7,00 N	26,82 A	-
7	14,40 C + 7,00 N	26,17 A	-
4	20,00 C + 6,30 N	-	29,58 A
11	20,00 C + 7,00 N	-	28,32 A
Testemunha (água destilada)		7,72 B	9,17 B
Teste F		103,59*	70,27*
CV (%)		14,89	17,26
Erro padrão da média		0,1066	0,1364

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$

* significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

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

CV = Coeficiente de variação.

5 CONCLUSÕES

- a) O arroz tipo 2 é produtivo e econômico para produção de *Metarhizium anisopliae*;
- b) O arroz parboilizado tipo 1 foi o meio de cultura mais produtivo e econômico para *Beauveria bassiana*;
- c) A farinha de milho amarela conferiu uma maior proteção aos conídios de *M.anisopliae* e *B. bassiana*;
- d) Os melhores meios para a produção de blastosporos são constituídos por menor concentração de nitrogênio e maior concentração de carbono;
- e) Para *M. anisopliae* os melhores meios de cultura foram aqueles que apresentaram D-glicose anidra (fonte de C) em sua composição e para *B.bassiana* os tratamentos que continham sacarose (fonte de C);
- f) *M. anisopliae* e *B. bassiana* são patogênicos e virulentos para lagartas de 3^o-ínstar de *Diatraea saccharalis*, quando aplicado como suspensão aquosa de conídios e blastosporos independente do meio de cultura.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; CRUZ, R.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e função do período e condições de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.50, n.1, p.57-63, 1983.
- AGUDELO, F.; FALCON, L.A. Mass production, infectivity, and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.42, p.124-132, 1983.
- ALI, S.; SIKOROWSKI, P.P. Effects of sunlight, cotton foliage surface, and temperature on the infectivity of cytoplasmatic polyhedrosis virus to *Heliothis virescens* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.79, n.2, p.364-367, 1986.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Controle da cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae), com *Metarhizium anisopliae* e óleo de nim, em cana-de-açúcar sob cultivo orgânico. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8, 2003, São Pedro, **Livro de Resumos...** São Pedro: 2003. p.65.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, 19pp., 2006.
- ALMEIDA, J.E.M.; MACHADO, L.A. Controle biológico de insetos e ácaros. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.15, 85pp., 2006.

ALVARENGA, A.R.M.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; SILVEIRA, A.P.; BULISANI, E.A. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.55, n.1/4, p.31-35, 1988.

ALVES, S.B. **Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.** 1982. 95p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ALVES, S.B. Epizootiologia. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** São Paulo: Ed. Manole, 1986a. p.29-60.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** São Paulo: Ed. Manole, 1986b. p.73-126.

ALVES, S.B. Patologia geral. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** São Paulo: Ed. Manole, 1986c. p.3-70.

ALVES, S.B. Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p.77-86, 1992.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998a. p. 289-380.

ALVES, S.B. Técnicas de laboratório: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998b. p. 22-37.

ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998c. p. 637-711.

ALVES, S.B.; FORTI, L.C.; CIVIDANES, F.J. Influence of light color on some biological activities *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. an entomopathogenic fungus. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v.24, n.2, p.123-125, 1980.

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Influência da luz sobre o crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals.). **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.4, n.1, p.43-50, 1979.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.14, p.188-192, 1989.

ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; PEREIRA, R.M.; MACEDO, N. Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento.

Ecossistema, Espírito Santo do Pinhal, v.12, p.78-87, 1987.

AQUINO, M.L.N. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v.72, p.1-26, 1974.

BALARDIN, R.S.; LOCH, L.C. Meios de cultura semi-sintéticos para a produção massal do fungo *Nomuraea rileyi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.375-381, 1989.

BARROS, N.M. de; RICARDO, K.R.; FACCHIN, I. Estudo do crescimento e germinação cinidial de linhagens do fungo *Nomuraea rileyi* em diferentes substratos. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.18, n.2, p.163-167, 1988.

BARSON, G. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* a pathogen of the larval stage of the large elm bark beetle, *Scolytus scolytus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Duluth, v. 29, p.361-366, 1977.

BASTOS, C.N.; MATTA, E.A.F. Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.15, n.1, p.5-8, 1976.

BASTOS, C.N.; MATTA, E.A.F. da; FIGUEIREDO, J.M. de. Esporulação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, em meios de cultura de diferentes composições. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.15, n.1, p.9-11, 1976.

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.

BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B.P.B.; CAMARGO, L.M.P.C.; OLIVEIRA, D.A. Crescimento de *Beauveria* sp., isolado de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), em meios de cultura naturais, líquidos. **Biológico**, São Paulo, v.51, n.1, p.17-21, 1985.

BIDOCHKA, M.J.; PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. **Mycopathologia**, Holanda, v.99, p.77-83, 1987.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 72, p.140-146. 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, Duluth, v.78, p.98-108, 2001b.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v.74, p.734-739, 2001c.

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, **Proceedings...**Londrina: 2002a. p.241-245.

BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, Estados Unidos da América, v.94, p.912-920, 2002b.

BROOME, J.R.; SIKOROWSKI, P.P.; NELL, W.W. Effect of sunlight on the activity of Nuclear Polyhedrosis virus from *Malacossoma disstria*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.67, n.1, p.135-136, 1974.

CAGAN, L; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konossu Saitama, v.2, n.4, p. 119-125, 2001.

CAMARGO, L.M.P.C. de Desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes meios de cultura naturais, sólidos. **Biológico**, São Paulo, v.49, n.4, p.107-109, 1983.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. Fungal cells and vegetative growth. In: _____. **The Fungi**. London: Academic Press, 1994. p.125-128.

- CLERK, T.C.; MADELIN, M.F. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. **Transactions British Mycological Society**. Cambridge, v.48, n.2, p.193-209, 1965.
- 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.
- CORRÊA, G.S.; AZEVEDO, J.L. de Influência da radiação solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.61, n.2, p.119-130, 1986.
- COSTA, M.D.M.; MAGALHÃES, C.D. Um novo meio de cultura para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., parasito da cigarrinha das pastagens. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.13, n.1, p.57-60, 1974.
- COUTINHO, J.L.B.; CAVALCANTI, V.A.L.B. Utilização do fungo *Beauveria bassiana* no controle biológico do bicudo-do-algodoeiro em Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, n.5, p.455, 1988.
- COUTINHO, J.L.B.; OLIVEIRA, J.V. de Patogenicidade do isolado I-149 de *Beauveria bassiana* (Bals. Vuil. a adultos de *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae)). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.20, n.1, p.199-207, 1991.
- CRUZ, B.P.B.; ABREU, O.C.; OLIVEIRA, D.A.; CHIBA, S. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de cultura naturais, líquidos. **Biológico**, São Paulo, v.49, n.5, p.111-116, 1983.
- DANGAR, T.K. et al. Mass production of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* in coconut water wasted from copra making industry. **Journal of Plantation Crops**, Kasangod, v.19, n.1, p.54-69, 1991.
- 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**, New York, v.41, p.143-50, 1983.
- DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J.A.; ERTOLA, R.J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. **Applied Microbiological Biotechnology**, Alemanha, v.33, p.712-715, 1990.

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**, Holanda, v.135, p.171-181, 1996.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; SMITS, N.; COUSTERE, C.; ITIER, B. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UV-B and UV-A) and visible radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, Duluth, v.69, p.70-78, 1997.

FARIA, M.R. de; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.22, p.18-21, 2001.

FENG, M.G.; POPRAWSKI, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.4, p.3-34, 1994.

FERNANDES, P.M.; VELOSO, V.R.S.; SOARES, R.A.B.; WATANABE, A.; SOUZA, H.D. Comparação de meios de cultura para produção massal de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4, 1994, Gramado. **Livro de Resumos...** Gramado: 1994. p.17.

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

FIGUEIREDO, M.F.S.; MARQUES, E.J.; LIMA, R.O.R.; OLIVEIRA, J.V. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepdoptera: Castniidae). **Biological Control**, Orlando, v.31, p.397-403, 2002.

FOURTOUNI, A.; MANETAS, Y.; CHRISTIAS, C. Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.76, p.2093-2099, 1998.

FRANCISCO, E.A. **Tolerância de bioinseticidas comerciais à base de *Metarhizium anisopliae* à radiação UV-A e UV-B e efeito do tempo de cultivo dos conídios.** 2004. 72f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FRANCO, M.P.J. **Tolerância de conídios às radiações UV-A e UV-B em função do tempo de cultivo de fungos entomopatogênicos.** 2005. 42f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. Fungi. In:___ **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Cap.4. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, p.255-282.

GRIEGO, V.M.; MARTIGNONI, M.E.; CLAYCOMB, A.E. Inactivation of nuclear polyhedrosis virus (*Baculovirus* subgroup A) by monochromatic UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos da América, v.49, n.3, p.709-710, 1985.

GRIMM, C.; GUHARAY, F. Control of leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* shield-backed bug *Pachycoris klugii* with entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.8, n.3, p.365-376, 1998.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico da CODECAP**, Recife, v.3, 54pp., 1974.

HSIAO, W.F. et al. Effects os diphenols on the growth of three entomopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1000-1003, 1992.

HU, W.; HOU, R.F.N; TALEKAR, N.S.; HU, W.J. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Riptortus linearis* (Hemiptera: Coreidae), a pest of soybean. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.31, n.2, p.187-194, 1996.

HUMPHREYS, A.M.; MATEWELE, P.; CUNLIFFE, B.; TRINCY, A.O.J.; JILLESPIE, A.T. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. **Mycological Research**, Amsterdam, v.92, p.257-64, 1989.

HUNT, T.R.; MORRE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride*. **Entomophaga**, Paris, v.39, n.4, p.312-322, 1994.

IBRAHIM, Y.B.; LOW, W. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. **International Journal of Pest Management**, London, v.39, n.3, p.288-292, 1993.

IGNOFFO, C.M.; BATZER, O.F. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.64, n.1, p.850-853, 1971.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, London, v.6, n.3, p.411-415, 1977.

INCH, J.M.; TRINCI, A.P.J. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinose* in liquid and solid media. **Journal of General Microbiology**, Tokyo, v.133, p.247-252, 1987.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.; 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.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptodulosporae) of grasshoppers under field conditions. **Biological Control**, Orlando, v.26, p.400-409, 1997.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.180-87, 1997.

JACKSON, M.A.; SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BOYETTE, C.D.; SILMAN, R.W.; BOTHAST, R.J. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v.10, p.645-650, 1996.

JAQUES, R.P. Stability of insect viruses in the environment. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E (Ed.). **Viral Insecticides for Biological Control**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 285-360.

JOHNSON, D. Response of terrestrial microorganisms to ultraviolet-B radiation in ecosystems. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, p.315-320, 2003.

KAWAKAMI, K.; MIKUNI, T. Effects of relative humidity and temperature on the viability of conidia of some muscardines. **Acta Sericologica**, Ibaraki, v.56, p.42-46, 1965.

KHALIL, S.K. et al. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.13, p.329-334, 1985.

KLEESPIES, R.G.; ZIMMERMANN, G. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in submerged culture. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.2, p.127-135, 1992.

LEACH, C.M. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.43, p.185-200. 1965.

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

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. 92p.

LENTEREN, J.C.; ROSKAM, M.M.; TIMMER, R. Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. **Biological Control**, Orlando, v.10, p.143-149, 1997.

LOMER, C.J.; BATEMAN, R.P.; JOHNSON, D.L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M.. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review Entomology.**, Palo Alto, v.46, p.667-702, 2001.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M.. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.6, p.839-846, 1998.

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. **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.15, p.19-23, 1990.

MACEDO, N.C.; MENDES, A. de C.; BOTELHO, P.S.M.; MAGRO, J.A. Insetos nas raízes e colo da planta, perfilhamento e produtividade em canaviais colhidos com e sem queima. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.15, p.18-21, 1997.

MARQUES, E.J. **Efeitos de formulações na preservação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sob diferentes condições de armazenamento.** 1993. 146f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B. Otimização de formulações na preservação de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.39, p.861-877, 1996.

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. **Livro de Resumos...** Viçosa: 1973. p.70.

MARQUES, E.J.; VILLAS BOAS, A.M.; PEREIRA, C.E.F. 1981. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em laboratórios setoriais. **Boletim Técnico Planalsucar**, Piracicaba, v.3, n.2, 23pp., 1981.

MARTINS, J.F. da S.; LIMA, M.G.D. de. Entomopathogenic fungi for the control of rice stem bug *Tibraca limbativentris* Stal.: virulence of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.23, n.1, p.39-44, 1994.

MATTA, E.A.F. da; OLIVEIRA, M.Z.A. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., “in vitro”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5, 1978, Ilhéus, **Livro de Resumos...** Ilhéus: 1978. p.78.

McCOY, C.W.; HILL, A.J.; KANAVEL, R.F. Large-scale production of the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* in submerged culture and its formulation for application in the field. **Entomophaga**, Paris. v.20, n.3, p.229-240, 1975.

McCOY, C.W.; KANAVEL, R.F. Isolation of *Hirsutella thompsonii* from the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*, and its cultivation on various synthetic media. **Journal of Invertebrate Pathology**, College Park, v.14, p.386-390, 1969.

McCOY, C.W.; TIGANO-MILANI, M.S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, Edição Especial, p.87-93, 1992.

MENDONÇA FILHO, A.; COSTA, L.C.G. Rendimentos da linhagem PL191 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11, 1987, Campinas. **Livro de Resumos...** Campinas: 1987. p.248.

MENDONÇA FILHO, A.; ROCHA, I.C.B. Produção de *Metarhizium anisopliae* no Estado de Alagoas, Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3, 1992, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos...** Águas de Lindóia: 1992. p.141.

MENDONÇA FILHO, A.; WILLIAM, R.; SILVA, M. Controle biológico da cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hem.: Cercopidae) em áreas de corte mecanizado de cana crua. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7, 2001, Poços de Caldas. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas: 2001. p.131.

MOHAN, K.S.; PILLAI, G.B. A method for laboratory scale mass cultivation of *Metarhizium anisopliae*. **Folia Microbiologica**, Prague, v.27, p.281-283, 1982.

MONTEIRO, A.C. **Aspectos fisiológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus)**. 1988. 233f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.

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

MOURA-COSTA, M.D.; MAGALHÃES, C.D., 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, parasito da “cigarrinha” das pastagens. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.13, p.57-60, 1974.

NAGESH, M.; REDDY, P.P. Influence of oil cakes in combination with inorganic fertilizers on growth and sporulation of *Verticillium lecanii*. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.25, p.9-11, 1997.

NAHAS, E.; ARAI, N.N.S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.18, n.1, p.77-82, 1987.

NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H.; BELEIA, A. Produção de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes tipos de arroz e técnicas de preparo. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7, 2001, Poços de Caldas. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas: 2001. p.388.

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.

OLIVEIRA, S.M.C. de. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PAUL, N.D.; GWYNN-JONES, D. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.48-55, 2003.

PENDLAND, J.C.; BOUCIAS, D.G. In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, Estados Unidos da América, v.89, n.1, p.66-71, 1997.

PEREIRA, R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.389-394, 1999.

RAGA, A.; BATISTA FILHO, A.; WATANABE, K.; MACHADO, L.A.; CRUZ, B.P.B.; SUPLICY FILHO, N. Observações sobre o comportamento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, cultivados em diferentes meios de cultura, sobre populações de *Cosmopolites sordidus* no campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11, 1987, Campinas. **Livro de Resumos...** Campinas: 1987. p.192.

ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v.10, n.3, p.1-80, 1977.

ROBERTS, D.W.; FLINT, S.D. Tools of the UV trade light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 1, 2002, Londrina. **Proceedings...** Londrina: 2002, p.237-240.

ROBINSON, R.K. Studies on penetration of insect in tegument by fungi. **Pesticide Article New Summ.** v.12, p.131-142, 1966.

ROMBACH, R.C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in sympoduloconidia in submerged culture. **Entomophaga**, Paris, v.34, p.45-52, 1989.

ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; ROBERTS, D.W. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. **Entomophaga**, Paris, v.33, p.315-324, 1988.

ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B.M.; ROBERTS, D.W. Infection of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). **Environmental Entomology**, Lanham, v.15, n.5, p.1070-1073, 1986.

ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D.E. the role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. **Ecology and Epidemiology**, v.75, n.5, p.510-514, 1985.

SANO, A.H. **Dosagens de extrato de levedura e glicose para produção de *Metarhizium anisopliae* em meio líquido**. 2005. 42f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SANTOS, A.L.L. dos **Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1978. 148f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de Sao Paulo, Piracicaba.

SILVEIRA NETO, S.S. Utilização de milho no cultivo em larga escala, do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11, 1987, Campinas. **Livro de Resumos...** Campinas: 1987. p.250.

SMITS, N.; FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; ITIER, B. Effects of temperature and solar radiation interactions on the survival of quiescent conidia of the entomopathogenic hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. **Mycophatologia**, Holanda, v.135, p.163-170, 1996.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS, C.G. (Ed.) **Biological Control in Crop Production**. New York: Allanheld & Osmun Publ., 1981, p.161-180.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, n.2, p.115-120, 1998.

SOUNDARARAJAN, K.; KUMARASWAMI, T.; ABDUL KAREEM, A. An easy method for mass multiplication of the entomopathogenic fungus *Cephalosporium lecanii* Zimm. **Current Science**, Bangalore, v.53, n.21, p.1152-1153, 1984.

TANZINI, M.R. **Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos.** 2002. 140f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TANZINI, M.R.; BATISTA FILHO, A. Produção de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown e Smith, em diferentes meios de cultura líquidos. **Ecosistema**, São Paulo, v.18, p.149-155, 1992.

THOMAS, K.C.; KRECHATOURIANS, G.G.; INGLEDEW, W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, p.12-20, 1986.

TUVESON, R.W.; McGOY, C.W. Far-ultraviolet sensitivity and photoreactivation of *Hirsutella thompsonii*. **Ann. Appl. Biol.**, v.101, p.13-18, 1982.

VALLE, T.L. **Influência da qualidade da luz no crescimento e esporulação do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** 1984. 78f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Faculdade de São Paulo, Piracicaba.

VALLE, T.L.; FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. Variabilidade em linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium anisopliae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7, 1980, Campinas. **Livro de Resumos...** Campinas: 1980. p. 347.

VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.99, n.2, p.101-103, 1993.

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**, Curitiba, 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**, Piracicaba, 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 LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3 e CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5, 1978, Bahia. **Livro de Resumos...** Bahia: 1978. p.70.

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**, New York, v.16, p.221-226, 1970.

WENZEL, I.M. **Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais sólidos e líquidos**. 2002. 79f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.40, n.1, p.36-40, 1982.