

CONTROLE BIOLÓGICO**Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) Após Armazenamento de Conídios em Baixa Temperatura**EDMILSON J. MARQUES¹, SERGIO B. ALVES² E IRENE M.R. MARQUES³¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE.²Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Caixa postal 9, 13418900, Piracicaba, SP.³Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE.

An. Soc. Entomol. Brasil 29(2): 303-307 (2000)Virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) After Conidia Storage at Low Temperature

Abstract - The viability (germination capability) and virulence of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill strain 447 was assessed after long term storage at a low temperature.. The experiments were initiated at the Laboratory of Insect Pathology of the Department of Entomology, Phytopathology and Zoology, ESALQ-USP (Piracicaba, SP) and concluded at the Laboratory of Insect Pathology, Department of Agronomy UFRPE (Recife, PE) conducted from May 1992 to January 1999. The fungus was produced on rice, and pure conidia with 15.5 % RH was stored in a freezer at $-7 \pm 1^\circ\text{C}$. The conidial viability and virulence towards *Diatraea saccharalis* larvae after 0, 5, 8, 50, 75 and 80 months of storage were evaluated. The stored fungus maintained 100% viability in all treatments and freezing was proven a good procedure for storing pure conidia of *B. bassiana* for at least 80 months. LT_{50} and mortality rate were 3.02 days and 92%, 3.86 and 96%, 3.97 and 92%, 4.05 and 94% and 3.97 and 96%, 4.10 days and 94%, respectively.

KEY WORDS: Insecta, entomopathogenic fungus, storage, sugarcane borer.

RESUMO - Verificou-se a viabilidade e virulência de conídios puros de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 447, armazenado por longos períodos em baixa temperatura. O experimento iniciou-se no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP (Piracicaba, SP) e teve seqüência no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Agronomia da UFRPE (Recife, PE), durante o período de abril de 1992 a janeiro de 1999. O fungo foi produzido em arroz pré-cozido e os conídios puros, com umidade de 15,5% foram armazenados em freezer, à temperatura de $-7 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 0, 5, 8, 50, 75 e 80 meses de armazenamento, a viabilidade dos conídios foi avaliada em meio BDA e a virulência foi testada sobre larvas de *Diatraea saccharalis* (F.). O fungo manteve

viabilidade de 100% em todos os tratamentos, com elevada virulência sobre larvas de *D. saccharalis*. Os resultados de TL_{50} e porcentagens de mortalidade foram de 3,0 dias e 92,0%; 3,86 e 96,0%; 3,97 e 92,0%; 4,05 e 94,0% e 4,0 e 96,0%; 4,1 dias e 94,0%, respectivamente. O armazenamento em freezer é, portanto, uma forma adequada de conservação de conídios puros de *B. bassiana* por pelo menos 80 meses.

PALAVRAS-CHAVE: Inseto, fungo entomopatogênico, armazenamento, broca da cana-de-açúcar.

A viabilidade e atividade biológica de fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pela temperatura, umidade, substrato, radiação ultra violeta e outros fatores. A maioria dos trabalhos efetuados com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. demonstra que com o aumento da temperatura e tempo de armazenamento, ocorre uma 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).

Roberts & Campbell (1977) discutiram a estabilidade de fungos entomopatogênicos e mencionaram 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.

Formulações em pó e granuladas estudadas por Daoust et al. (1982) reduziram a virulência de *M. anisopliae* em relação a conídios não formulados, quando armazenadas a 4 e 20°C durante oito e 12 meses. Os componentes mais prejudiciais foram sabugo de milho, diatomácea e dois outros provenientes de caulim, tendo os valores de TL_{50} aumentado de 2,5 para mais de seis dias quando o fungo foi aplicado em larvas de *Culex pipiens pipiens* (Liston)

(Diptera: Culicidae). As diferenças na viabilidade dos conídios não foram relacionadas com a virulência. Esses resultados demonstram a necessidade da realização de bioensaios com as formulações para verificação da atividade biológica, antes da aplicação do produto no campo. No entanto, trabalhos efetuados com formulações e conídios puros de *B. bassiana* isolado 447, constataram correlação positiva entre a viabilidade de conídios e mortalidade de larvas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Marques 1993, Alves et al. 1996).

Daoust & Roberts (1983a, b) estudando três linhagens de *M. anisopliae* em quatro temperaturas e seis umidades relativas, mencionaram que as melhores condições para armazenamento e manutenção de viabilidade e virulência de conídios foram 19°C a 97% UR e 4°C a 0% UR, quando permaneceram virulentos por 18 meses para larvas de *C. pipiens pipiens* (Liston) 12 meses para *Anopheles stephensi* (Liston) (Diptera: Culicidae).

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*.

Neste trabalho, procurou-se verificar o efeito do armazenamento prolongado em freezer sobre a viabilidade e virulência de conídios puros de *B. bassiana* com baixo teor de umidade, sobre lagartas de *D. saccharalis*.

Material e Métodos

O experimento foi iniciado em abril de 1992 no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia Fitopatologia, e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP (Piracicaba, SP) e concluído em janeiro de 1999 no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Agronomia da UFRPE (Recife, PE).

O fungo *B. bassiana*, isolado 447, registrado no Banco de Patógenos da ESALQ/USP, foi obtido inicialmente de *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera: Formicidae). Sua produção foi efetuada em meio semi-sólido, utilizando-se 300g de arroz pré-cozido e autoclavado em saco de polipropileno. Após a inoculação no meio de cultura, os sacos foram colocados em câmara climatizada a 26°C durante tres dias e em seguida o meio foi transferido para bandejas plásticas, onde permaneceu durante 15 dias, para crescimento e secagem do fungo, conforme metodologia proposta por Alves & Pereira (1989). Posteriormente o meio de cultura foi peneirado manualmente em peneira com 1,2 mm de malha, obtendo-se conídios puros com umidade de 15,5%. Vale salientar, que os conídios correspondem a aproximadamente 3% do peso total do meio de cultura utilizado.

O ensaio consistiu no acondicionamento de uma amostra de 30 g de conídios do fungo, em tubo de plástico, seguido de armazenamento em freezer, a $-7 \pm 1^\circ\text{C}$. Os tratamentos corresponderam aos diferentes períodos de armazenamento, ou seja, 0, 5, 8, 50, 75 e 80 meses.

Para os testes de viabilidade, foram preparadas suspensões de 0,1 g de conídios em 10 ml de água estéril com espalhante adesivo (0,01% de Tween 80). Posteriormente, 0,1 ml da suspensão foi transferido para três placas de Petri contendo meio BDA

(Batata + Dextrose + Agar) mais antibiótico, e incubadas em câmara climatizada tipo BOD a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase. As leituras foram efetuadas contando-se 100 conídios por placa, 24 horas após o plaqueamento, totalizando 300 conídios em cada avaliação. A virulência foi avaliada utilizando-se 50 lagartas de terceiro estádio de *D. saccharalis*, provenientes de criação artificial em dieta modificada de Hensley & Hammond (1968). Os insetos foram pulverizados com uma suspensão de *B. bassiana* na concentração de 10^8 conídios/ml, com o auxílio de um atomizador manual modelo "De Vilbiss" e a testemunha pulverizada com água estéril e espalhante adesivo (0,01% de Tween 80). Posteriormente as lagartas foram individualizadas em pedaços de colmo de milho empregados para alimentação. Após 10 dias de avaliação a mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbott e acumulada para efetivação da análise de Probit e obtenção dos tempos letais (TL_{50}) dos diferentes tratamentos.

Resultados e Discussão

O fungo armazenado em freezer durante 80 meses manteve 100% de viabilidade e elevada virulência, uma vez que causou 94,0% de mortalidade em lagartas de *D. saccharalis* (Tabela 1). O tempo de armazenamento não afetou significativamente o TL_{50} ($F = 2,30$; $P = 0,203$; $r^2 = 0,36$), embora tenha ocorrido um prolongamento desse tempo em aproximadamente 30%. Estes resultados estão de acordo com Alves *et al.* (1996), quando verificaram que conídios não formulados de *B. bassiana*, armazenados em tempo semelhante em freezer na temperatura de -10 a -7°C , mantiveram 100% de viabilidade e ocasionaram mortalidade elevada de lagartas de *D. saccharalis*. Com relação aos valores de viabilidade e patogenicidade de *B. bassiana* foram observados resultados concordantes com Hassan *et al.* (1989), que trabalhando com *M. anisopliae* constataram que a elevada percentagem de viabilidade dos conídios correspondeu a alta mortalidade de

Tabela I. Mortalidade de *D. saccharalis* por *B. bassiana* após diferentes períodos de armazenamento a -7°C. Temperatura de 26 ± 1°C e 12h de fotofase. ESALQ-USP/ UFRPE. 1992-1999.

Armazenamento (meses)	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ * (dias)
0	100	92,0	3,02 (2,04-4,49)
5	100	96,0	3,86 (3,11-4,81)
8	100	92,0	3,97 (3,35-4,71)
50	100	94,0	4,05 (3,41-4,82)
75	100	96,0	3,97 (3,38-4,66)
80	100	94,0	4,10 (3,57-4,73)

* TL₅₀ Tempo letal

lagartas de *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). O aspecto mais importante e comprovado neste trabalho, refere-se ao desempenho dos conídios puros de *B. bassiana*, quando armazenado em freezer, podendo dispensar a etapa de formulação, operação esta, geralmente prejudicial para a estabilidade dos fungos entomopatogênicos (Cruz et al. 1985). Assim, em função da maior necessidade de utilização desse fungo no controle de pragas, este procedimento poderá ser adotado por biofábricas visando à preservação a longo prazo do entomopatógeno.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao revisor anônimo pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Literatura citada

Abreu, O.C., P.J. Valarini, R.P.B. Cruz, D.A. Oliveira & D. Gabriel. 1983. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok em função do período e condições de armazenamento. Arq. Inst. Biol. 50: 57-63.

Alves, S.B., S. Silveira Neto, R.M. Pereira & N. Macedo. 1987. Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. Ecosistema 12: 78-87.

Alves, S.B. & R.M. Pereira. 1989. Produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. Ecosistema 14: 188-192.

Alves, S.B., J.L. Stimac, R.M. Pereira & S.A. Vieira. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. Bioc. Sci. Technol 6: 575-581.

Batista Filho, A. & M.A. Cardelli. 1986. Viabilidade dos esporos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. Biológico 52:57-59.

Cruz, B. P.B, O.C. Abreu, P. Vilarini & D.A. Oliveira. 1985. Efeito da temperatura, tempo de armazenagem e do tipo de preparo sobre o poder germinativo de

esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, cultivado em arroz. Arq. Inst. Biol. 52: 45-57.

Daoust, R.A., M.G. Ward & D.W. Roberts. 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 40: 228-236.

Daoust, R.A. & D.W. Roberts. 1983a Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 41: 143-150.

Daoust, R.A. & D.W. Roberts. 1983b. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 41: 161-170.

Hassan, A.E.M., R.J. Dillon & A.K. Charnley. 1989. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. J. Invertebr. Pathol.

54: 277-279.

Hensley, S.D. & A.M. Hammond. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61 : 1742-1743.

Marques, E.J. 1993. Efeitos de formulações na preservação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sob diferentes condições de armazenamento. Tese de Doutorado, ESALQ-USP, Piracicaba, 146 p.

Marques, E.J. & S.B. Alves. 1996. Otimização de formulações na preservação de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. Arq. Biol. Tecnol. 39: 861-877.

Roberts D.W & A.S. Campbell. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. Miscellaneous Publications. Entomol. Soc. Am. 10:1-80.

Recebido em 17/05/99. Aceito em 30/03/00.
