

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VIRGÍNIA MICHELLE SVEDESE

**PROCESSO DE INFECÇÃO DE *Beauveria bassiana* SOBRE A BROCA DA CANA-
DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

RECIFE/PE

2012

VIRGÍNIA MICHELLE SVEDESE

Processo de infecção de *Beauveria bassiana* sobre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof^a Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima

Svedese, Virginia Michelle

Processo de infecção de *Beauveria bassiana* sobre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)/ Virginia Michelle Svedese. – Recife: O Autor, 2012.

123 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Elza Áurea de Luna Alves Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia

1. Broca (inseto)
2. Fungos como agentes no controle biológico de pragas
3. Cana-de-açúcar I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo II. Lima, Elza Áurea de Luna Alves III. Título.

363.78

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-072

Processo de infecção de *Beauveria bassiana* sobre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Recebeu a menção Aprovada

Banca examinadora

Titulares:

Profª Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Depto. de Morfologia e Fisiologia animal/UFRPE- Orientadora)

Profª Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Depto. de Bioquímica/ UFPE)

Profª Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Depto. de Micologia/UFPE)

Profª Dra. Tatiana Souza Porto– (Unidade Acadêmica de Garanhuns/URFPE)

Profª Dra. Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha (Departamento de Biologia Celular e Genética/ Universidade Estadual de Maringá)

Suplentes:

Profª Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Depto. de Bioquímica/UFPE - Suplente)

Profª Dr. Bruno Severo Gomes (Depto. de Micologia/UFPE – Suplente)

*À minha mãe, Virgínia, minha imensa
gratidão e admiração.*

DEDICO.

“Então, que seja doce. Repito todas as manhãs, ao abrir as janelas para deixar entrar o sol ou o cinza dos dias, bem assim: que seja doce”.

Caio Fernando Abreu

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca ter desistido de mim e por ter me dado forças e conforto pra continuar sempre.

Em especial à minha mãe, por todo amor, carinho e compreensão. Mulher guerreira sem a qual eu não teria chegado até aqui. Ao seu marido, Mário, que me criou como filha e me educou.

Aos meus avós e meus familiares por me amarem e me ajudarem, sem muitas vezes entender o porquê.

Ao meu pai, por sua dedicação à minha educação.

À minha grande amiga, Jhinny, por ter compartilhado vários momentos comigo e sempre ter me confortado e acreditado no meu sucesso. Sem dúvida foi um porto seguro.

À minha querida professora, Elza Áurea de Luna-Alves Lima, que teve papel direto na minha formação acadêmica e orientando-me desde a iniciação científica, é com grande prazer que finalizo mais esta etapa sob sua co-orientação.

À minha querida orientadora, Ana Lúcia Figueiredo Porto, pelos valiosos conhecimentos e acima de tudo, pela sua confiança e apoio. Obrigada pela oportunidade!

À professora Laura, por todo apoio e incentivo, pelos momentos de ciência e também de descontração. Muchas gracias!

Ao pessoal do laboratório de Citologia e Genética, Amanda, Ana, Carlos, Diogo, Diany, Geanne, Leandro, Marília e Sueny. Pelos bons momentos e pela ajuda nas horas de aperto.

Em particular a Jadson e a Patrícia, por toda contribuição e aprendizado ao longo desses anos.

À Ana Portela e Rosineide, embora distantes, por tudo que aprendemos juntas e compartilhamos, nunca vão deixar de fazer parte da minha história acadêmica.

Aos amigos Manoela, Conceição, Nelho, Wanda, Mário e Max pelos momentos de descontração e de amizade ao longo de 13 anos.

Aos professores do Departamento da Micologia que contribuíram na minha formação acadêmica e pelos bons momentos compartilhados, em especial à Cristina Motta, Oliane, Bruno Gomes, Rejane Pererira Neves e Sidney Turyassú Gomes Bastos. Agradeço também a Eliane, técnica da Micoteca URM, pelos bons serviços prestados.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas por ajudarem a preencher algumas lacunas do conhecimento científico e consolidar minha formação.

Às professoras Tatiana Porto e Keila Aparecida Moreira pela gentileza e apoio na realização dos ensaios enzimáticos.

Ao pessoal da Biotecnologia do LIKA, Carolina, Cyinthia, Daniele Renata, Marcela, Milena e Roberto Afonso pela ajuda e convivência harmoniosa. Um obrigado especial a Gisele e a Germana Michelle pela amizade e por todo tempo concedido aos meus experimentos.

Às amigas do PPGCB: Djanah, Marilia Coriolano, Lidiane e Tereza, pelos bons momentos e carinho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, na pessoa da coordenadora
Maria Tereza Correia

À secretária mais solicitada e disposta do PPGCB: Adenilda. Obrigada pela força!

À Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina pelo fornecimento das larvas de
Diatraea saccharalis.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela
conceção da bolsa de estudo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram com que esta pesquisa fosse realizada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	4
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Broca da cana-de-açúcar <i>Diatraea saccharalis</i>	5
3.1.2 Danos e métodos de controle da broca da cana-de-açúcar	8
3.2 Características do gênero <i>Beauveria</i> Vuillemin	12
3.2.1 O Uso de <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin no Controle Biológico de Pragas	14
3.3 Patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> contra Lepidoptera	19
3.4 Fatores que interferem na patogenicidade fúngica	22
3.4.1 Fatores Abióticos	23
3.4.2 Fatores Bióticos	27
3.5 Enzimas degradadoras de cutícula	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5. CAPÍTULO I	
Effect of Exposure Method to <i>Beauveria bassiana</i> and Production of Cuticle-Degrading Enzymes in the Presence of <i>Diatraea saccharalis</i> Cuticle	60
1. Introduction	62
2. Material and methods	63

2.1 <i>Diatraea saccharalis</i> larvae	63
2.2 Reactivated inoculums suspension	64
2.3 Pathogenicity of <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i>	65
2.4 Effects of the methods of infection by <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i> : spraying, dipping and stalks exposed to fungus	65
2.5 Statistical analysis.....	66
2.6 Enzyme assays.....	67
3. Results	68
3.1 Pathogenicity of <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i>	68
3.2 Effect of methods of infection of <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i>	69
3.3 Production of subtilisin-like and trypsin-like enzymes and chitinase in the presence of the cuticle of sugarcane borer	69
4. Discussion	71

6. CAPÍTULO II

Horizontal transmission and the effect of temperature in pathogenicity of <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae)	86
1. Introduction	88
2. Material and Methods.....	90
2.1 <i>Diatraea saccharalis</i> larvae	90
2.2 Fungal strains.....	90

2.3 Effect of temperature on pathogenicity of the <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i>	91
2.4 Horizontal transmission of <i>Beauveria bassiana</i> between <i>Diatraea saccharalis</i> larvae	91
2.5 Statistical analysis	92
2.6 Results and Discussion.....	92

7. CAPÍTULO III

Influência da luz ultravioleta e da temperatura sobre os parâmetros biológicos de <i>Beauveria bassiana</i>	105
1. Introdução.....	107
2. Material e Métodos	108
2.1 Linhagens fúngicas	108
2.2 Obtenção das colônias irradiadas	108
2.3 Germinação dos conídios	109
2.4 Esporulação	109
2.5 Crescimento radial	110
2.6 Análise estatística	110
3. Resultados e Discussão	110
3.1 Germinação dos conídios	110
3.2 Esporulação	113
3.3 Crescimento radial	115
4. Conclusões	117
8. CONCLUSÕES GERAIS	123

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Produção da cana-de-açúcar no Brasil	6
Figura 2. Ciclo de vida da <i>Diatraea saccharalis</i> : A - ovo; B - larva; C - pupa; D- adulto	8
Figura 3: Danos diretos e indiretos causados por <i>Diatraea saccharalis</i> em cana-de-açúcar	9
Figura 4: Larva de <i>Diatraea saccharalis</i> infectada por <i>Beauveria bassiana</i>	13
Figura 5: Cultura de <i>Beauveria bassiana</i> em BDA com 12 dias de crescimento	13
Figura 6: Espécies entomopatogênicas mais comuns de <i>Beauveria</i>	13
Figura 7: Ciclo de <i>Nomuraea rileyi</i> (Farlow) Samson em lagarta de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	23
Figura 8: Esquema da cutícula de um inseto	29

CAPITULO I

Fig. 1: Mortality (%) of third stadium larvae *Diatraea saccharalis* following different methods of exposure to *Beauveria bassiana* URM2915, URM2930 and URM4548. Bars with the same between strains letter do not differ statistically ($p < 0.01$). Data were arcsine transformed before analysis 82

CAPITULO II

Figure 1: Mortality (%) of *Diatraea saccharalis* larvae inoculated with *Beauveria bassiana* (URM 2915 and URM3447) under different temperatures..... 102

CAPITULO III

Figura 1: Percentual de germinação de *Beauveria bassiana* URM2915 e URM3447 após exposição à luz UV (a) e após incubação em diferentes temperaturas (b). Colunas seguidas da mesma letra, entre diferentes tempos (a) e temperaturas (b), não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0.05$)111

Figura 2: Germinação dos conídios de *Beauveria bassiana* URM2915 após 24h de incubação, sem exposição à luz UV (A) e após exposição de 15 (B), 30 (C) e 50 segundos (D). 112

Figura 3: Crescimento radial de *Beauveria bassiana* (URM2915 e URM3447) após exposição à luz UV (a) e após incubação em diferentes temperaturas (b). Colunas seguidas da mesma letra, entre linhagens, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1: <i>Beauveria bassiana</i> strains deployed in the experiments and their pathogenicity against <i>Diatraea saccharalis</i> larvae	81
Table 2: Factorial analysis of the strains, culture media and incubation times in the production of proteases (Pr1 and Pr2) and chitinases by <i>Beauveria bassiana</i> in the presence of <i>Diatraea saccharalis</i> cuticle	83
Table 3: Subtilisin-like (Pr1) activity (U/ml) in supernatant cultures of <i>Beauveria bassiana</i> grown in minimal medium (MM) and minimal medium plus <i>Diatraea saccharalis</i> cuticle (MM+CUT) ^a	84
Table 4: Trypsin-like (Pr2) activity (U/ml) in supernatant cultures of <i>Beauveria bassiana</i> grown in minimal medium (MM) and minimal medium plus <i>Diatraea saccharalis</i> cuticle (MM+CUT) ^a	84
Table 5: Chitinolytic activity (U/ml) in supernatant cultures of <i>Beauveria bassiana</i> grown in minimal medium (MM) and minimal medium plus <i>Diatraea saccharalis</i> cuticle (MM+CUT) ^a	85

CAPÍTULO II

Table 1: Median Lethal Time (LT ₅₀) of <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Diatraea saccharalis</i> at different temperatura.....	103
---	-----

Table 2: Horizontal Transmission of <i>Beauveria bassiana</i> from inoculated <i>Diatraea saccharalis</i> larvae to clean larvae at different proportions	104
--	-----

CAPÍTULO III

Tabela 1: Esporulação de <i>Beauveria bassiana</i> URM2915 e URM3447 após diferentes tempos de exposição à luz UV.....	114
---	-----

Tabela 2: Esporulação de <i>Beauveria bassiana</i> após 10 dias de incubação em diferentes temperaturas	115
--	-----

RESUMO

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, é uma das pragas mais prejudiciais aos canaviais brasileiros, causando anualmente elevadas perdas econômicas. *Beauveria bassiana* é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado no controle biológico de várias pragas agrícolas. Os entomopatógenos possuem vários determinantes de patogenicidade, incluindo a produção de enzimas degradadoras de cutícula e são muito sensíveis a fatores bióticos e abióticos, que influenciam na sobrevivência, na propagação e na infecção do hospedeiro. No presente trabalho, foi avaliada a eficiência de três métodos de inoculação fúngica contra esta broca e a capacidade de *B. bassiana* em produzir proteases (Pr1 e Pr2) e quitinases em meio mínimo na presença e ausência da cutícula da broca. Posteriormente, analisou-se o efeito da radiação ultravioleta (UV) e da temperatura sobre o desenvolvimento de *B. bassiana* e sua transmissão horizontal entre indivíduos de *D. saccharalis*. Os métodos de mergulho e pulverização conidial causaram elevada mortalidade, enquanto que larvas alimentadas com colmos infectados com a suspensão fúngica apresentaram mortalidade variando de 26 a 42%. A produção das enzimas foi maior no meio contendo cutícula, indicando que ela é estimulada por componentes específicos da cutícula do hospedeiro. A atividade da Pr1 foi maior do que a da Pr2 e ambas foram produzidas a partir de 24h. A maior produção de quitinase foi obtida às 96h para todas as linhagens testadas. Foi possível demonstrar relação entre a produção enzimática e a virulência do fungo. As linhagens foram mais patogênicas a 26 e a 32°C do que a 20°C, com mortalidade de 100, 50 e 30,3%, respectivamente. *B. bassiana* foi eficazmente transmitida entre os indivíduos da broca, causando mortalidade significativa e essa capacidade pode representar uma nova estratégia de controle. O tempo de exposição à luz UV e a temperatura interferem de diferentes modos no desenvolvimento deste fungo.

Palavras-chave: controle biológico, enzimas, broca da cana-de-açúcar, temperatura, luz ultravioleta.

ABSTRACT

The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, is one of the worst pests in Brazilian sugarcane crop, causing high levels of financial losses every year. *Beauveria bassiana* is an entomopathogenic fungus widely used in the biological control of several agricultural pests. Entomopathogenic fungi have a number of determinants of pathogenicity, including production of cuticle-degrading enzymes, moreover, they are very sensitive to biotic and abiotic factors that influence the survival, spread and infection of the host. Thus, we evaluated the efficiency of three fungal inoculation methods against this borer and *B. bassiana*'s capacity to produce proteases (Pr1 and Pr2) and chitinase in the presence of the cuticle of sugarcane borer. Subsequently, we analyzed the effect of ultraviolet radiation and temperature on biological parameters of *B. bassiana* and its horizontal transmission capacity among *D. saccharalis*. The dip and conidial spray methods led to high mortality, whereas larvae fed with stalks infected with the fungal suspension had mortality levels varying between 26 and 42%. The production of enzymes was higher in the medium containing cuticle, showing that the process is stimulated by specific components found in the cuticle of the host. Pr1 activity was higher than Pr2 and both were produced at 24h. The highest production of chitinase was obtained at 96h of culture for all strains test. It was possible to demonstrate the relationship between enzyme production and virulence of the fungus. The strains were most pathogenic at 26 and 32°C than at 20°C, with respective mortalities of 100, 50 and 30.3%. *B. bassiana* was effectively transmitted between

individuals, leading to significant mortality and this ability may represent a new control strategy. The exposure time to UV light and temperature affect in different ways on biological parameters of this fungus.

Keywords: biological control, enzymes, sugar cane borer, temperature, ultraviolet light.

1. INTRODUÇÃO

Introduzida durante o período colonial, a cana-de-açúcar transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, também é o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível, como alternativa energética (MAPA, 2011). Devido às extensas áreas de cultivo da cana-de-açúcar distribuídas por todo território brasileiro, bem como as condições destas regiões, esta cultura propicia um agroecossistema muito favorável ao desenvolvimento de insetos-praga, entre estas, a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (PINTO et. al., 2006).

A broca da cana-de-açúcar é uma das principais pragas responsáveis por perdas econômicas, pelos danos diretos e indiretos à cultura da cana-de-açúcar e do milho (ALMEIDA et al., 1988; CAMPOS & MENDONÇA, 2004). O dano direto provocado pela broca ocorre por meio da abertura de galerias no interior do colmo da planta, reduzindo o fluxo de seiva, além de torná-la mais suscetível ao tombamento pela ação do vento e da chuva. O dano indireto se dá quando os orifícios favorecem a penetração de microrganismos fitopatogênicos no interior do colmo (GALLO et al., 2002).

Em função desse hábito, as medidas convencionais de controle, por meio de inseticidas químicos direcionados para a larva, são praticamente ineficientes (CRUZ, 2007). Uma alternativa viável de controle é o emprego de fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, que vêm sendo amplamente utilizados como biocontroladores de vários insetos-praga (ALVES, 1998). A eficiência de *B. bassiana* já foi comprovada contra diversos lepidópteros, como *Plutella xylostella* L. (VANDENBERG et al., 1998), *Chilo*

partellus Swinhoe (TEFERA & PRINGLE, 2003) e *Castnia licus* Drury (VILAS BÔAS & ALVES, 1988). Contudo, estes fungos são muito sensíveis aos fatores bióticos e abióticos, que influenciam na sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Entre os abióticos, a radiação solar ultravioleta (UV) é a mais importante, pois pode inativar os conídios, provocar danos letais ao DNA e causar mutações (FARGUES et al., 1996). A viabilidade e atividade dos fungos também podem ser influenciadas pela temperatura, umidade, substratos e modo de exposição ao hospedeiro (TEFERA & PRINGLE, 2003).

Os fatores bióticos mais relevantes dizem respeito aos mecanismos de virulência. Os fungos entomopatogênicos apresentam vários determinantes de patogenicidade, incluindo a produção de enzimas degradadoras de cutícula, tais como, proteases (tipo-subtilisina Pr1 e tipo-tripsina Pr2) e quitinases (ST. LEGER, 1995). Essas enzimas são referidas como responsáveis pelo início da infecção, já que hidrolisam complexos poliméricos de proteínas e quitinas, os maiores constituintes da cutícula do inseto (GABRIEL, 1968). Gupta et al. (1994) mostraram a relação entre os níveis de produção enzimática e a virulência de *B. bassiana* contra *Galleria mellonella* L. e *Trichoplusia ni* Hübner.

Quanto à produção das proteases degradadoras de cutícula por *B. bassiana*, Campos et al. (2005) demonstraram que a síntese de Pr1 é controlada por um circuito múltiplo, sendo reprimida por determinadas fontes de carbono e nitrogênio. Alguns trabalhos demonstraram que a produção de proteases por *B. bassiana* foi aumentada em presença de cutícula da broca-do-café *Hypothenemus hampei* Ferrari (DIAS et al., 2008) e do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (DONATTI et al., 2008).

O estudo da produção de protease e de quitinase é importante no estabelecimento da infecção no inseto e torna-se fundamental, para um melhor

entendimento dos mecanismos de penetração do fungo no hospedeiro. Assim, tais atividades poderão estar relacionadas com o grau de virulência de *B. bassiana* contra o inseto alvo.

A análise do efeito do método de inoculação e sua relação com os fatores abióticos mais relevantes para o desenvolvimento do fungo entomopatogênico é muito importante quando a finalidade é o controle biológico e deste modo, todos estes fatores devem ser levados em consideração na seleção de linhagens fúngicas a serem empregadas no controle biológico de pragas.

2.OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes métodos de infecção de *Diatraea saccharalis* por *Beauveria bassiana*, analisar a produção de enzimas degradadoras de cutícula da broca da cana-de-açúcar e demonstrar o efeito da luz ultravioleta e da temperatura sobre o desenvolvimento de *B. bassiana*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar a eficiência dos diferentes métodos de infecção de *D. saccharalis* por *B. bassiana*;
- Avaliar a produção de proteases extracelulares do tipo-subtilisina (Pr1), tipo-tripsina (Pr2) e quitinase por linhagens de *B. bassiana* em meio líquido na presença e ausência de cutícula de *D. saccharalis*;
- Relacionar a produção das enzimas degradadoras da cutícula com os parâmetros de virulência de *B. bassiana* contra *D. saccharalis*;
- Avaliar a capacidade de disseminação dos conídios de *B. bassiana* entre os indivíduos de *D. saccharalis*;
- Demonstrar os efeitos da temperatura sobre a patogenicidade de *B. bassiana* contra *D. saccharalis*;
- Avaliar o efeito da luz UV e da temperatura sobre a germinação, esporulação e crescimento radial de *B. bassiana*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), uma gramínea semiperene de origem asiática é umas das principais culturas no Brasil, sendo de extrema importância sócio-econômica em virtude de seus derivados, principalmente o álcool e o açúcar (CIB, 2009).

Nesta última década, o Brasil passou a ser o maior exportador mundial dos produtos derivados da cana-de-açúcar, com menores custos de produção, sendo cultivada na maioria dos estados, porém sua maior produção concentra-se no Estado de São Paulo, com aproximadamente 60% da produção nacional. Na Região Nordeste, as plantações são extensas em grandes áreas dos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe (CONAB, 2012) (Figura 1). Esse comportamento do mercado está relacionado diretamente com o avanço das exportações de açúcar e à maior demanda interna de álcool com o aumento de venda dos carros movidos a biocombustíveis, baseada na tecnologia *flex fuel* (UNICA, 2008).

A estimativa da produção nacional da cana-de-açúcar na safra de 2011/2012 deverá atingir 571,47 milhões de toneladas. Este volume representa uma queda de 8,4% em relação à safra 2010/11, que foi de 623,905 milhões de toneladas. As causas foram diversas, mas, o clima foi o principal causador da queda da produção, em consequência das adversidades ocorridas de abril até outubro de 2010, com chuvas escassas em toda a região Centro-Oeste e Sudeste (CONAB, 2011).

Além disso, o cultivo da cana-de-açúcar sofre interferência de vários fatores que afetam diretamente a sua produção, dentre eles destacam-se os fitossanitários. A condição de monocultura fragiliza essa monocotiledônea, podendo ser atacada por mais de 80 espécies de pragas que contabilizam perdas de aproximadamente 20% ao ano, considerando somente o ataque de pragas, sendo *Diatraea saccharalis* a principal delas (ALMEIDA et al., 1988; ROSSETTO & SANTIAGO, 2007).

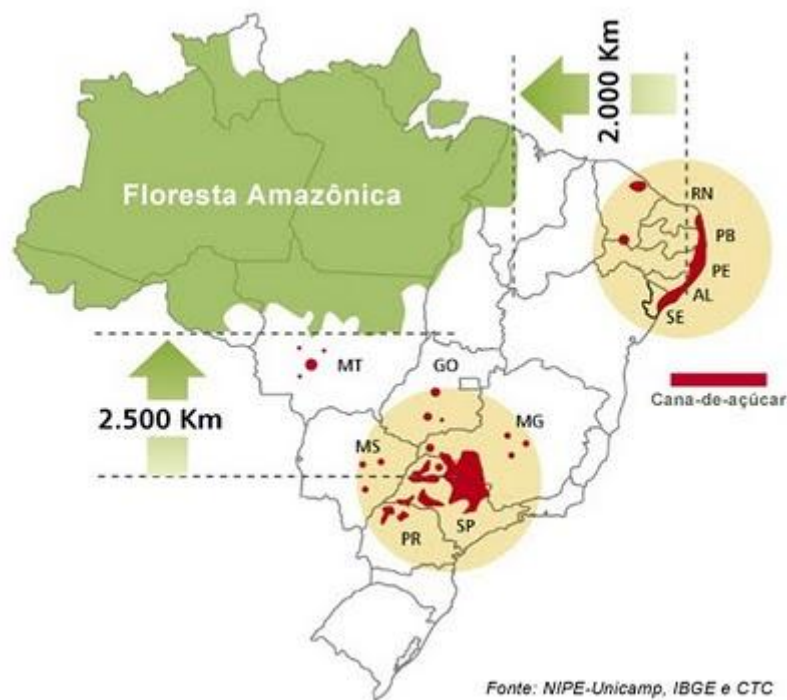


Figura 1: Produção da cana-de-açúcar no Brasil (Fonte: UNICA, 2010).

Entre as espécies do gênero, *D. saccharalis* é a mais amplamente distribuída. Podendo ser encontrada no sul dos EUA, passando pelas Antilhas e México, no Brasil e Argentina (BOX, 1931; SANTILLANA et al., 2003; TRUMPER, 2007).

De acordo com Gallo et al. (2002), os ovos da broca são colocados na face dorsal das folhas, com um agrupamento muito característico assemelhando-se a uma escama de peixe, contendo cerca de 5 a 50 ovos. Cada fêmea pode colocar de 300 a 600 ovos. As larvas apresentam coloração amarelada clara, com cabeça marrom, podendo atingir um comprimento de 2 a 4 mm (1º ínstar), 6 a 9 mm (2º ínstar), 10 a 15 mm (3º ínstar), 15 a 20 mm (4º ínstar) e 20 a 30 mm (5º ínstar). As lagartas de 1º ínstar alimentam-se do parênquima foliar até a 1ª ecdise, quando passam a caminhar em direção ao colmo. Entre o 2º e 3º ínstar, as brocas penetram no colmo na região do entrenó, abrindo galerias longitudinais e transversais até a fase de pupa.

A transformação em pupa acontece dentro da planta, em um túnel criado pela larva. A pupa é alongada e fina, de cor marrom e mede entre 16 a 20mm, ficando no interior da planta até a emergência dos adultos. O adulto, de hábito noturno, é uma mariposa amarelo-palha, tendo 25 mm de envergadura, sendo as fêmeas maiores com abdômen dilatado e os machos com o último par de pernas coberto por cerdas, apresentando em média 2 a 9 dias de vida (HOWARD, 1981; PINTO et al., 2006) (Figura 2).

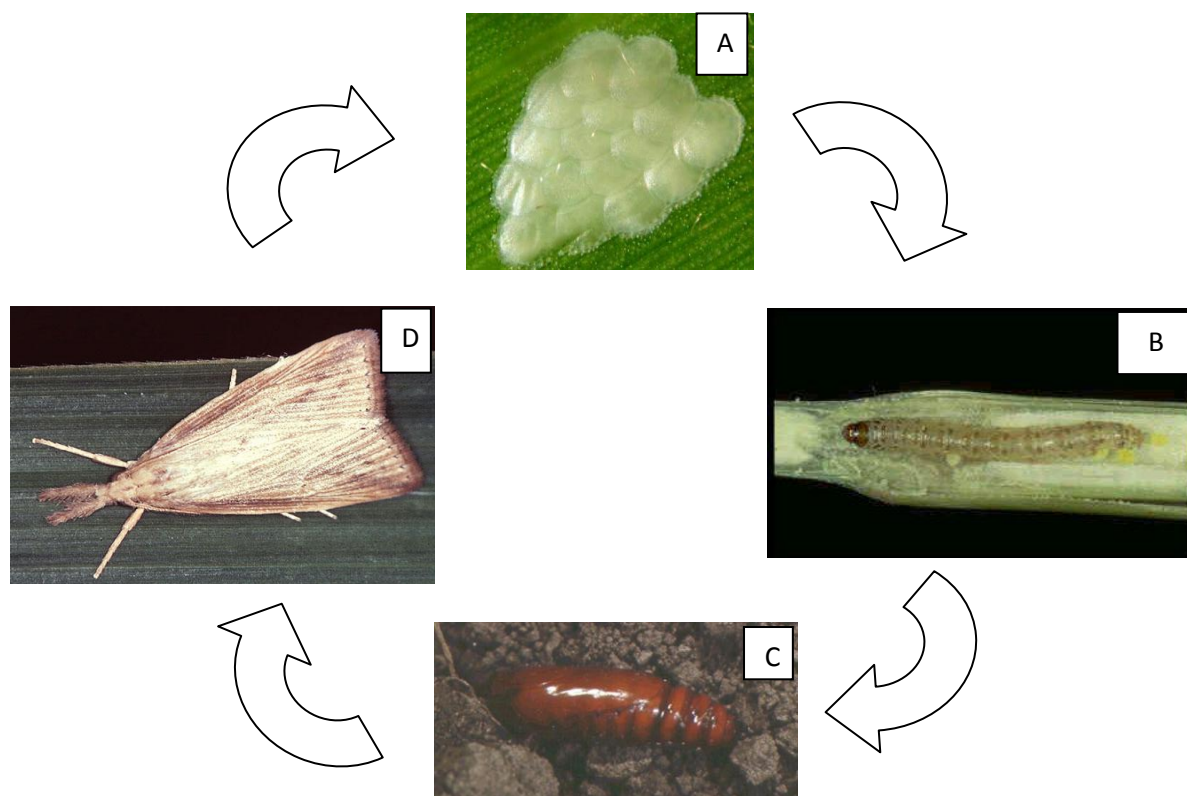


Figura 2. Ciclo de vida da *Diatraea saccharalis*: A - ovos; B - larva; C - pupa; D- adulto (MACEDO, 2005).

3.1.2 Danos e métodos de controle da broca da cana-de-açúcar

Diatraea saccharalis apresenta a mesma capacidade para causar danos em várias outras culturas, como milho, arroz e sorgo (BOIÇA JÚNIOR & LARA, 1997; BARRIGOSSI et al., 2004; TRUMPER, 2004).

A broca causa prejuízos diretos e indiretos (Figura 3). Os diretos são observados em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. Uma infestação no início da cultura (canas com até quatro meses de idade) pode danificar a região meristemática da planta (gema apical) causando o sintoma conhecido como coração morto. Nas plantas adultas, os danos causam brotações laterais, enraizamento aéreo, perda de peso, afinamento e

quebra do colmo, atrofia de entrenós e morte da planta, o que leva a uma acentuada queda de produção (PARRA, 1993). Por meio de abertura de galeria no interior do colmo, o fluxo da seiva é reduzido e torna a planta mais suscetível ao tombamento pela ação do vento e das chuvas (GALLO, 2002).

Os prejuízos indiretos também são expressivos. Através da abertura de galerias e outros orifícios causados pela broca, penetram fungos causadores da podridão vermelha. Os fungos mais comuns são *Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium verticiloides* (Sacc.) Nirenberg que degradam a sacarose, diminuindo assim a pureza e a qualidade do caldo, acarretando um menor rendimento de álcool e açúcar (PARRA et al., 2002).



Figura 3: Danos diretos e indiretos causados por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. Fonte: http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/broca-do-colmo_375.html

Em virtude dos relevantes prejuízos ocasionados pela praga, o seu controle é indispensável. Contudo uma vez no interior do colmo, o uso de inseticidas torna-se ineficiente, além de forçaram a evolução dessas pragas e o surgimento de espécies resistentes (BORTOLI et al., 2004). Métodos alternativos de controle, como o uso de inimigos naturais, devem ser priorizados.

Alam et al. (1971), relataram a redução de infestação de *D. saccharalis* nos campos de Barbados, após o estabelecimento da mosca cubana *Lixophaga diatraeae* Townsend e a vespa *Cotesia flavipes* Cameron, sugerindo que as mesmas possuem potencial para um efetivo controle da broca. No Brasil, para minimizar os prejuízos causados pela broca, foi iniciado um programa de controle desta praga em 1973, pelo Instituto do Açúcar e do Alcool/Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (IAA/PLANALSUCAR). Botelho (1992) ao longo de 15 anos de pesquisa enfatizou os principais parasitóides larvais desta praga: *Metagonistylum minense* Townsend, *Parathesia claripalpis* Wulp e *C. flavipes*. Este último se destacou como o melhor controlador e se consolidou como o principal biocontrolador desta broca. Para o controle, são realizadas liberações de vespinhas, parceladas ou únicas, com uma média de 6.000 adultos (fêmeas + machos)/ha/ano, sendo que essa população não deve ser inferior a 2.500 nem superior a 10.000. As vespinhas devem ser liberadas de forma a cobrir toda a área-problema, posteriormente, transferindo-se o controle para outro local (MARUCCI, 2006).

Outros parasitóides também são testados no controle da broca. Estudos mostraram que o *Trichogramma galloi* Zucchi é produzido em larga escala em laboratório e sua liberação apresenta êxito no controle da *D. saccharalis* (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2007).

O uso de inimigos naturais no controle desta praga não se resume aos parasitóides. Outra classe de agentes que merece destaque é a dos fungos entomopatogênicos. Esses agentes foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano e aproximadamente 80% das doenças de insetos tem como agentes etiológicos, os fungos (ALVES, 1998).

Trabalhos de Alves et al. (1985), mostraram a eficiência de *B. bassiana* contra *D. saccharalis* em condições de campo e constatarem mortalidade de 47,5% e 56%, respectivamente para $3,7 \times 10^7$ e $3,7 \times 10^8$ conídios/mL.

De acordo com Folegatti (1985) a aplicação conjunta de *M. anisopliae* e *C. flavipes* é mais eficiente contra a broca do que a aplicação do fungo isoladamente. Além disso, o fungo não se mostrou patogênico à vespinha, podendo ser utilizado em associação ao parasitóide para um controle mais eficiente da broca.

Marques et al. (2000) avaliaram a viabilidade e a eficiência de um isolado de *B. bassiana* estocado em freezer por 0, 5, 8, 50, 75 e 80 meses contra *D. saccharalis*. O fungo manteve viabilidade de 100% em todos os tratamentos e a mortalidade variou de 92 a 96%.

O efeito da fase leveduriforme e conídios de *B. bassiana* contra *D. saccharalis* e *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) foi avaliado por Alves et al. (2002). Os autores observaram que *D. saccharalis* foi mais suscetível às estruturas leveduriformes, apresentando mortalidade de 70%, enquanto que as suspensões de conídios causaram apenas 30%.

Ainda como medida para controle da broca, pode ser feito o plantio de variedades resistentes ou tolerantes de cana-de-açúcar e eliminação de plantas hospedeiras nas proximidades (SEGATO et al., 2006). Adicionalmente, os métodos culturais de controle podem ser adotados. Estes se baseiam na utilização os

conhecimentos ecológicos e biológicos das pragas. Os mais comuns são: rotação de culturas, aração do solo, época de plantio e colheita e destruição de restos de cultura (ROSSETTO & SANTIAGO, 2007).

3.2 Características do gênero *Beauveria* Vuillemin

O gênero *Beauveria*, pertencente à Classe Hyphomycetes (ALEXOPOULOS et al., 1996), é reconhecido no mundo inteiro por sua importância no controle biológico. Segundo Alves (1998), *Beauveria* é parasito de um grande número de artrópodos (Figura 4), ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos.

Este gênero foi estabelecido por Vuillemin em homenagem a Beauverie, renomado entomologista francês da época. O fungo foi encontrado pela primeira vez em 1835 por Agostino Bassi sobre *Bombyx mori* L, o bicho da seda, causando a doença muscardine branca, devido à cor da sua colônia (Figura 5). Balsamo-Crivelli, micologista italiano, colocou o fungo no gênero *Botrytis* e o nomeou *Botrytis bassiana*. Em 1912, Vuillemin reestudou o fungo e o nomeou *Beauveria bassiana* (Balsamo), colocando a espécie em sinonímia (BENHAM & MIRANDA, 1953; MACLEOD, 1954). De Hoog (1972) em uma monografia sobre o gênero, considerou três espécies: *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, que possui conídios uninucleados globosos ou subglobosos produzidos em conidióforos formados por densos cachos. Conidiogênese com terminações em zigue-zague, seguindo o modelo fialídico simpodial (LUNA-ALVES LIMA, 1989); *B. brongniartii* (Saccard) Petch, com conídios elipsóides produzidos em conidióforos escassos e raramente em cachos e *B. alba* (Limber) com fiálides dispersas ao longo do eixo do conidióforo. Samson & Evans (1982) citaram

ainda duas espécies novas: *B. velata* Samson & Evans, de conídios globosos a elipsóides, predominantemente verrucosos e cobertos com camada gelatinosa e *B. amorpha* (Hohn) Samson & Evans, de conídios lisos, cilíndricos e freqüentemente dilatados em uma extremidade (Figura 6).



Figura 4: Larva de *Diatraea saccharalis* infectada por *Beauveria bassiana*.

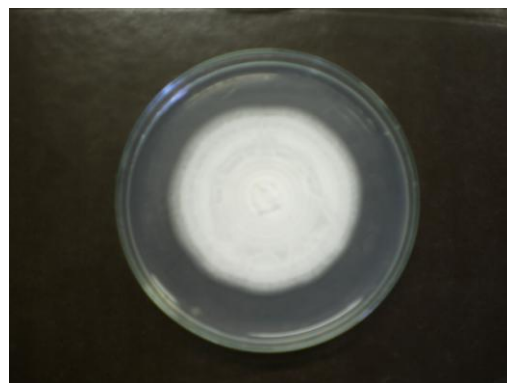


Figura 5: Cultura de *Beauveria bassiana* em BDA com 12 dias de crescimento.

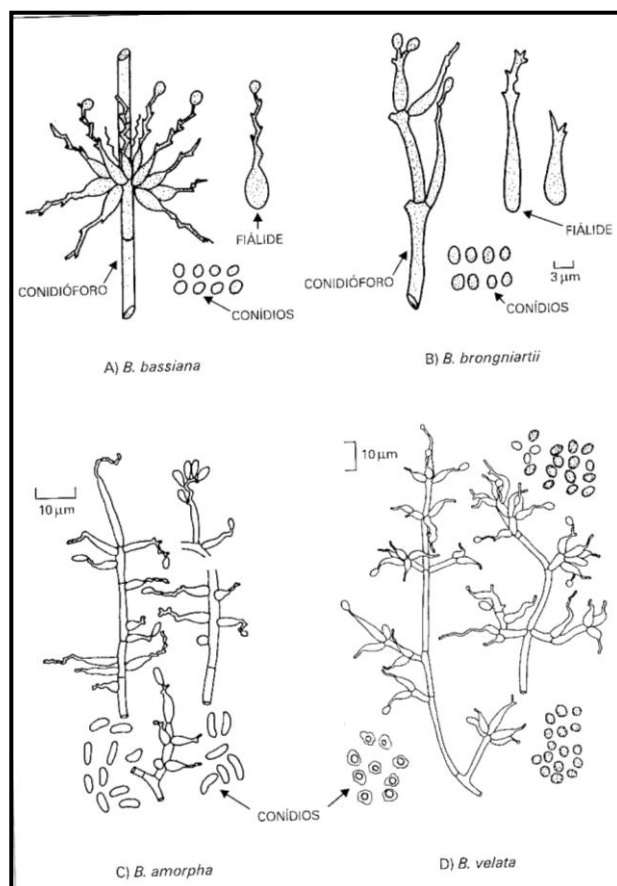


Figura 6: Espécies entomopatogênicas mais comuns de *Beauveria* (ALVES, 1998).

3.2.1 O Uso de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin no Controle Biológico de Pragas

Uma alternativa viável e promissora ao controle químico de pragas é o emprego de inimigos naturais, prática conhecida como Controle Biológico. Este controle é uma das formas de manter as populações de insetos em equilíbrio no ambiente, limitando a rápida multiplicação destes, sem causar danos a outros organismos. As vantagens dos agentes entomopatogênicos em relação aos pesticidas químicos consistem na eficiência, no custo, na segurança do homem, na redução de resíduos tóxicos aos alimentos e à preservação dos inimigos naturais no ecossistema (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos fitófagos, aquáticos, pragas de solo e de causar epizootias naturais. Têm grande versatilidade e podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros. Entre os fungos entomopatogênicos, os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* são considerados os mais importantes (ONOFRE et al., 2002).

Beauveria bassiana é de ocorrência generalizada em todos os países, sendo a mais frequente sobre os insetos e em amostras do solo, onde pode subsistir por longo tempo. Tornou-se conhecida internacionalmente pelo produto Boverin, formulação que contém 6×10^9 conídios/g, sendo recomendado para controle de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) (ALVES, 1998).

Estudos realizados por Sanchez-Peña (2000) relataram a ocorrência de inimigos naturais de pragas em algumas localidades desérticas do México. Os insetos foram coletados de diferentes áreas e dentre os microrganismos identificados, os fungos

ocorreram em maior número. *Beauveria bassiana* foi isolada de *Calligrapha* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) que atacava plantações de repolho e de *Crocidema* sp. (Coleoptera: Curculionidae) que infestava pomares de maçã. O fungo foi observado em 56 dos 82 besouros infectados, mostrando que é um importante inimigo natural desta ordem. Com a mesma finalidade, Bustillo et al. (2002) fizeram um levantamento dos inimigos naturais e competidores da broca-do-café, na região cafeeira colombiana. Apesar da recente introdução da broca do café na Colômbia, foram registrados 25 inimigos naturais, sendo *B. bassiana* a mais freqüente das cinco espécies fúngicas encontradas. A presença natural de *B. bassiana* em culturas de cana-de-açúcar de várias províncias de Cuba, a partir de *D. saccharalis* que possuíam sintomas de micoses foi registrada por Estrada et al. (2004). Foram coletadas 63 amostras do inseto em folhas e nos talos das plantas obtendo um total de 48 isolamentos e 210 culturas puras de *B. bassiana*. Esses estudos merecem destaque, pois reafirmam o potencial deste fungo como biocontrolador natural de diferentes pragas agrícolas

Em laboratório, De La Rosa et al. (2002) mostraram a ação de diferentes linhagens de *B. bassiana* sobre larvas e fêmeas adultas da mosca mexicana das frutas (*Anastrepha ludens* Loew) (Diptera: Tephritidae). Os autores verificaram que o fungo causou apenas 2-8% de mortalidade em larvas, zero% em pupas e elevada mortalidade em adultos 82-100%, na concentração de $1,2 - 1,6 \times 10^8$ conídios/mL. Dimbi et al. (2003) avaliaram a eficiência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de adultos de três espécies de moscas das frutas, *Ceratitis capitata* Weidemann, *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch e *C. cosyra* Walker (Diptera: Tephritidae), em condições de laboratório. Segundo os autores todos os isolados testados foram patogênicos para as espécies testadas, causando mortalidade que variou de 7 a 100% em *C. capitata*, de 11,4

a 100% em *C. rosa* var. *fasciventris* e de 72–78% em *C. cosyra* após quatro dias de inoculação.

Loreiro & Monteiro (2004) avaliaram a ação de *B. bassiana* sobre operárias de *Atta sexdens sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae). As pesquisas registraram que a mortalidade acumulada, provocada pelo isolado AM 9 de *B. bassiana*, três dias após a inoculação, foi de 21 e 45% para as concentrações de $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^9$ conídios/mL, respectivamente, não ocorrendo diferença significativa entre as concentrações fúngicas testadas (10^6 a 10^9 conídios/mL). Por outro lado, foi verificada pouca diferença no tempo letal da menor concentração (4,83 dias) quando comparado ao proporcionado pela maior concentração (2,16 dias). Portanto, não só as concentrações devem ser levadas em consideração na escolha de isolados fúngicos, o tempo letal também é determinante no sucesso dos fungos entomopatogênicos para o controle biológico de pragas.

Neves & Hirose (2005) selecionaram isolados de *B. bassiana* para o controle da broca-do-café. A mortalidade entre os isolados variou de 62,7 a 91,3%. Destacando-se entre eles o isolado CG 425, que apresentou maior mortalidade corrigida e confirmada e maior taxa de esporulação em todas as concentrações.

A suscetibilidade dos estágios biológicos da *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae) foi testada a isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Isaria fumosoroseus* Wise (= *Paecilomyces fumosoroseus*) sob condições de laboratório. Quando *B. bassiana* foi aplicada sobre ovos da mosca os dados mostraram que a emergência de adultos foi de 11,3% para o isolado BB17 e de 43,8% para o isolado BB21, mostrando que o fungo foi eficiente em atrasar o seu desenvolvimento. Já sobre adultos o fungo foi capaz de produzir mortalidade de 40% e 73,8% na concentração de 10^8 conídios/ml (ANGEL-SAHAGUN et al., 2005).

Experimentos em laboratório mostraram que a mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, foi suscetível a *M. anisopliae* e a *B. bassiana* a partir de 10^5 conídios/mL. Os fungos interferiram em diferentes fases de desenvolvimento dessa mosca e a mortalidade de adultos foi acima de 90% (PORTELA-SILVA, 2007; SVEDESE, 2007).

Pesquisas realizadas no Departamento de Agricultura de Manhattan investigaram o efeito da modificação da atmosfera na eficácia de *B. bassiana* no controle de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) (LORD, 2009). A mudança na atmosfera é utilizada amplamente como estratégia de controle de pragas de grãos armazenados. A redução de 5% de oxigênio e elevação de 40% de gás carbônico nas primeiras 72h de exposição ao fungo causou maior mortalidade larval, do que quando os insetos foram tratados com o fungo na atmosfera ambiente, mostrando que o fungo foi patogênico. Os resultados mostraram ainda que a modificação dos gases reduziu o crescimento fúngico e o aumento de CO₂ atrasou a germinação dos conídios, porém *B. bassiana* se manteve eficaz no controle de *T. castaneum*.

Outra perspectiva no uso de fungos entomopatogênicos é sua associação com extratos vegetais para aumentar a eficiência no controle biológico. Estudos de compatibilidade são feitos para a seleção de linhagens (MARQUES et al., 2004; DEPIERI et al., 2005). Araújo Jr. et al. (2009) testaram a eficiência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para o controle do pulgão *Lipaphis erysimi* Kaltenbach (Homoptera: Aphididae) em couve (*Brassica oleracea* L.), e a compatibilidade dos fungos com óleo de nim (Neemseto®). Os bioensaios com o produto à base de nim nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2,0% foram realizados por imersão foliar e pulverização sobre os pulgões. O tratamento com pulverização de 2,0% de Neemseto proporcionou mortalidade de 90%. O teste *in vitro* do óleo a 0,125%, 0,25% e 0,5%, sobre os isolados CG 001 de *B.*

bassiana e CG 30 de *M. anisopliae* mostrou que esses isolados podem ter seu crescimento colonial e viabilidade alterados quando expostos às duas maiores concentrações de nim.

Além de grande sucesso no controle de pragas agrícolas, diversos pesquisadores já demonstraram a eficácia deste fungo no controle de parasitos de animais. Prette et al. (2005) estudaram a patogenicidade de *B. bassiana* sobre o carrapato canino *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. Os isolados aplicados nas diferentes concentrações de conídios causaram redução no percentual de eclosão de larvas oriundas de ovos infectados (0,7 a 12,1% de eclosão) e no percentual de ecdise de larvas (4,7 a 33,7% de ecdise) e ninfas (zero a 16,7% de ecdise). Evidencia-se, portanto intensa atividade patogênica do fungo em todo o ciclo de vida do carrapato, importante requisito na seleção de linhagens para programas de controle biológico. No mesmo sentido, Lekimme et al. (2008) avaliaram a ação *in vitro* de *B. bassiana* contra o parasita de coelhos *Psoroptes ovis* Hering (Acari: Psoroptidae). Foram avaliados os seguintes aspectos: efeitos da concentração conidial na viabilidade de fêmeas adultas, influência da infecção na fertilidade e a transmissão da infecção entre os parasitas. Segundo os autores, na concentração de 10^9 conídios/mL, o fungo matou 50% dos parasitas em 1,6 dias. As fêmeas expostas ao fungo não tiveram sua fertilidade diminuída, contudo a eclosão de ovos foi de apenas 39,4% contra 90,2% do grupo controle. As larvas oriundas de fêmeas infectadas morreram em poucos dias (1,25) e todos os parasitas saudáveis colocados em contato com os parasitas infectados morreram rapidamente (3,75 dias). A partir desses resultados os autores inferiram que *B. bassiana* tem um alto potencial contra o *P. ovis* e pode ser utilizada em programas de controle do parasita.

Estudos recentes mostraram que fungos entomopatogênicos isolados de diferentes áreas da china, foram patogênicos para as fêmeas ingurgitadas do carrapato

Hyalomma anatolicum anatolicum Koch, destacando-se *B. bassiana* que causou mortalidade acima de 90% (SUN et al., 2011).

3.3 Patogenicidade de *Beauveria bassiana* contra Lepidoptera

A ordem Lepidoptera compreende os insetos conhecidos por borboletas e mariposas. Na forma jovem se apresentam sob a forma de lagartas, totalmente diferentes dos adultos. É justamente nesta fase que são prejudiciais à agricultura, pois são fitófagas (GALLO, 2002).

Como relatou Alves (1998), *B. bassiana* ocorre no campo de forma enzoótica e epizoótica em Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera. Com base nesse potencial, vários estudos foram feitos para avaliar sua ação em condições de laboratório contra espécies dessas Ordens. Giustolin et al. (2001) testaram a virulência de *B. bassiana* contra lagartas de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) que foram criadas em dois genótipos de tomateiro. As lagartas foram alimentadas com folhas de tomateiros tratadas com suspensão de conídios e a mortalidade foi avaliada diariamente até o final da fase larval. A aplicação do fungo nos dois genótipos provocou mortalidade nas lagartas em todos os *instars*, durante o experimento. Esses resultados indicam que o referido patógeno é promissor no controle do inseto. Ressalta-se que os possíveis efeitos adversos, dos fatores químicos produzidos pelos dois genótipos da planta sobre o fungo, não foram observados em nenhum dos experimentos.

Já Hicks et al. (2001) analisaram o efeito de *B. bassiana* sobre o desenvolvimento de *Panolis flammea* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae). O fungo utilizado foi reisolado de larvas de *P. flammea* coletadas numa floresta na Escócia. Nos experimentos contra ovos deste inseto, *B. bassiana* causou mortalidade de 100% na

maior concentração ($7,2 \times 10^4$ conídios/mL). Nas larvas a mortalidade também foi elevada, contudo as pupas não foram suscetíveis ao fungo. Resultados como esses fornecem informações importantes, para a escolha do melhor momento da aplicação do entomopatógeno no campo.

Estudos realizados por Silva et al. (2003) selecionaram linhagens de *B. bassiana* e *M. anisopliae* que foram patogênicas para a traça das crucíferas *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Os autores testaram cinco linhagens de cada fungo na concentração de 10^8 conídios/mL. A mortalidade causada por *B. bassiana* variou de 78% a 90% decorridos oito dias após a inoculação. Com base nesses estudos os autores selecionaram os isolados ESALQ 634 e ESALQ 447 como os mais virulentos a este lepidóptero.

Devido à grande variabilidade genética existente dentro da espécie *B. bassiana* e diante da importância econômica da broca da cana-de-açúcar, estudos de patogenicidade contra *D. saccharalis*, continuam sendo a primeira etapa na seleção de linhagens mais eficientes para utilização em controle biológico (WENZEL, et al., 2006; OTTATI-DE-LIMA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Pesquisadores do México demonstraram o potencial de *B. bassiana* contra um peculiar lepidóptero que ataca plantações de cacto nesse país. Larvas de outro inseto infectadas artificialmente com o fungo foram colocados em contato com *Laniifera cyclades* Druce (Lepidoptera: Pyralidae) em experimentos no campo e em casa de vegetação. A mortalidade causada por *B. bassiana* foi superior a 90% e o TL_{50} foi de 5,1 dias para o isolado mais virulento (LOZANO-GUTIÉRREZ & ESPANA-LUNA, 2008).

Xiao-Mu Ma et al. (2008) estudou a interação entre uma proteína citotóxica (Cry1Ac) produzida pelo *Bacillus thuringiensis* e *B. bassiana* na mortalidade e

sobrevivência de *Ostrinia furnacalis* Guenee (Lepidoptera: Crambidae). Os resultados mostraram que quando larvas de 3º instar do inseto foram expostas a combinação de *B. bassiana* ($1,8 \times 10^5$, $1,8 \times 10^6$ ou $1,8 \times 10^7$ conídio/mL) e Cry1Ac, (0.2 ou 0.8 µg/g), o efeito na mortalidade foi aumentado; contudo quando a concentração da proteína foi elevada houve antagonismo. Assim *B. bassiana* pode ser utilizada juntamente com a Cry1Ac para o controle de *O. furnacalis* respeitando-se os limites de concentração de Cry1 Ac, não excedendo 0,8 µg/g.

Pesquisas foram realizadas por Kaur e Padmaja (2008) com o intuito de avaliar a virulência de *B. bassiana* contra *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) e sua caracterização por PCR-RAPD. Foram caracterizadas 25 linhagens do fungo, isoladas de diferentes hospedeiros e diferentes origens geográficas. O *cluster* padrão baseado na distribuição geográfica, refletiu de certa forma a semelhança genética entre os isolados. Todos os isolados ficaram agrupados de acordo com sua origem, contudo a patogenicidade do fungo foi independente de sua origem geográfica ou hospedeiro e de modo geral as linhagens de *B. bassiana* foram classificadas como moderadamente virulentas contra *S. litura*.

Em 2009, experimentos testaram se *B. bassiana* se tornaria endofítica em *Sorghum bicolor* L. e se traria proteção à planta contra o ataque da broca do caule, *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). Após a inoculação artificial de *B. bassiana*, esta se estabeleceu como endofítica e 20 dias após a infestação artificial com as brocas, as plantas tiveram 40% menos brocas do que as plantas não tratadas com *B. bassiana* (REDDY et al., 2009). Estes resultados demonstraram o potencial de proteção que o fungo, enquanto endofítico pode fornecer à planta.

Estudos recentes realizados por Abood et al. (2010) demonstraram a ação de *B. bassiana* contra *Atteva sciodoxa* Meyrick (Lepidoptera: Yponomeutidae). Os dois

isolados mais patogênicos causaram mortalidade de 100% e 83,3%, e tiveram tempos letais de 3,6 e 4,1 dias, respectivamente. A lagarta quando exposta a essas linhagens ainda diminuiu a alimentação em 55,8 a 72,5%.

Wright et al. (2010), testaram 43 isolados de *B. bassiana* de diferentes origens geográficas contra 8 espécies de lepidópteras que atacam várias culturas vegetais. A virulência variou entre os isolados, contudo a maioria foi patogênica contra os insetos testados. Na busca de linhagens que ataquem o maior número de pragas, os estudos reafirmam a importância de bioensaios para a seleção de linhagens.

3.4 Fatores que interferem na patogenicidade fúngica

Como relatado por Alves & Lecuona (1998), a simples presença de uma estrutura do patógeno sobre um inseto ou dentro dele não é condição suficiente para a ocorrência de uma doença. O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende de vários fatores (bióticos e abióticos), assim como das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro (Figura 7).

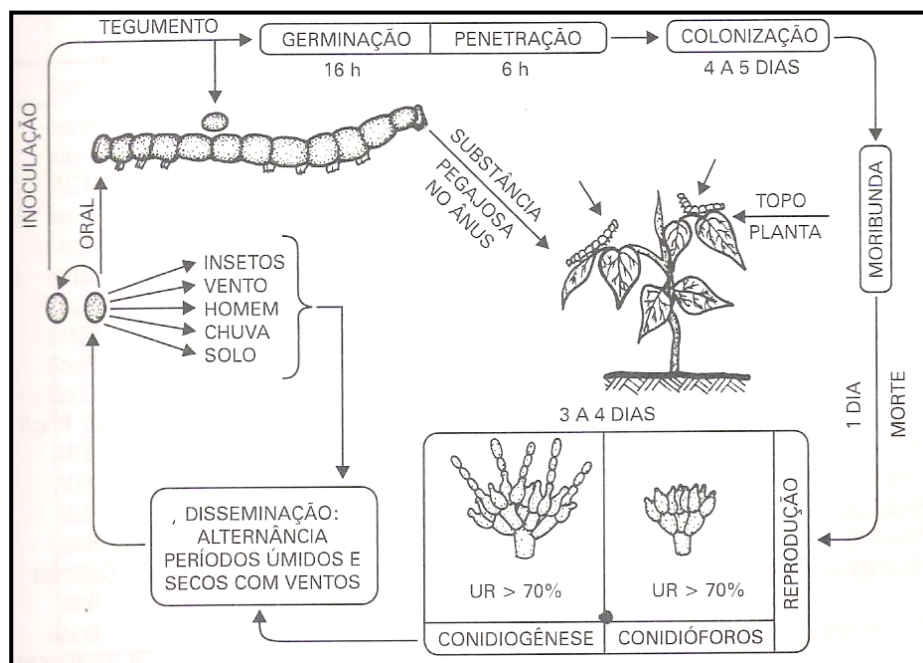


Figura 7: Ciclo de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre lagarta de *Anticarsia gemmatilis* Hubner (ALVES, 1998)

3.4.1 Fatores Abióticos

Dos vários fatores ambientais que afetam os patógenos de insetos, a temperatura, umidade e radiação solar são provavelmente os mais severos (INGLIS et al., 1996).

A temperatura afeta diretamente o crescimento, a germinação e o potencial infectivo dos fungos entomopatogênicos (DIMBI, et al., 2004; BROOKS et al., 2004). De acordo com Hallsworth & Magan (1999), o crescimento ótimo de *B. bassiana* foi obtido a 25°C, porém este fungo apresentou bom crescimento numa faixa de 20 a 30°C. Quando exposto a temperaturas mais elevadas, como por exemplo, a 37°C, o crescimento foi quase nulo. Conseqüentemente, qualquer estratégia de aplicação de *B. bassiana* no campo como micoinseticida precisar levar em consideração as condições climáticas que prevalecem nas áreas alvo (LUZ & FARGUES, 1997).

Tefera & Pringle (2003) investigaram em laboratório os efeitos dos métodos de exposição e concentração conidial de *B. bassiana* na mortalidade *Chilo partellus* e ainda investigaram o efeito de diferentes temperaturas na micose e esporulação em cadáveres do inseto. A maior porcentagem de micose foi obtida a 20°C, na concentração de $1,25 \times 10^7$ conídios/mL, enquanto a esporulação foi maior na temperatura de 15°C. Já Devi et al. (2005), avaliaram os efeitos da elevada temperatura e do estresse hídrico sobre a germinação e o crescimento de 29 isolados de *B. bassiana* e demonstraram que a viabilidade dos mesmos foi afetada quando submetidos à temperatura de 32, 35, 38 e 42°C, sendo a última temperatura a mais nociva para os dois parâmetros analisados.

Alexandre et al. (2008) mostraram o efeito da temperatura na virulência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra larvas e adultos do cascudinho, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). Todos os isolados foram patogênicos a 26°C, com mortalidade máxima de 93,3 e de 95,5% para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente. Quando estes fungos foram incubados a 32°C, a mortalidade larval foi de 68,9 e 28,9 %. Nessa temperatura apenas *B. bassiana* causou mortalidade de adultos (26,6%).

Luz & Fargues (1997), evidenciaram em seus experimentos o efeito da umidade relativa (UR) no desenvolvimento de *B. bassiana*. Estes autores observaram que aproximadamente 100% dos conídios de *B. bassiana* germinaram quando a UR foi acima de 95,5%. Diferentemente, quando a UR foi abaixo de 90%, não houve germinação até 96 horas de observação.

Nos estudos da influência da temperatura e umidade sobre o desenvolvimento de *M. anisopliae* sobre *Rhipicephalus annulatus* Say, foi registrado pela primeira vez a

ocorrência de clamidosporos na superfície desse carrapato. Nos ensaios a 25°C e 100% UR a mortalidade foi de 100% e foram observados conídios na superfície dos carrapatos infectados. Entretanto, quando os ovos foram incubados a 30°C e 100% UR ou a 25°C e 55% UR, sua mortalidade foi perto de 73% e só havia clamidosporos na superfície. O aparecimento de clamidosporos apenas sob condições desfavoráveis indica que eles são provavelmente uma estrutura alternativa de sobrevivência para fungos entomopatogênicos, possibilitando assim que o ciclo de vida seja reiniciado apenas sob condições favoráveis (MENT et al., 2010).

Conídios de *Isaria fumosorosea* foram submetidos a três regimes de temperatura e umidade, simulando as condições microclimáticas de regiões temperadas (43% UR e 28°C a 98% UR e 15°C), subtropicais (75% UR e 35°C a 98% UR e 25°C), e áreas áridas (13% UR e 40°C a 33% UR e 15°C). A germinação, contagem de colônias e virulência contra larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith foram menos afetadas sob as condições temperadas. Esta melhor adaptação pode estar relacionada com a origem geográfica do isolado (BOUAMAMA et al, 2010).

Os efeitos adversos causados pela radiação ultravioleta já foram demonstrados por diversos autores e é extremamente importante na seleção de linhagens para formulações de bioinseticidas para aplicação no campo (BRAGA et al., 2002; RANGEL et al., 2005; FERNANDES et al., 2007). Braga et al. (2001) mostraram que a exposição à radiação UV-B atrasou a germinação de *M. anisopliae*, sendo esta diretamente proporcional ao tempo de exposição. Assim, a sobrevivência dos conídios deve ser significativamente maior se os fungos forem aplicados durante períodos do ano e/ou do dia, quando a irradiação é menor.

Thompson et al. (2006), avaliaram a viabilidade conidial de *B. bassiana* no gramado após níveis altos e baixos de irrigação. Os resultados mostraram que a alta irrigação (5,1cm/semana) manteve a viabilidade dos conídios 8-12% maior do que a baixa e sugerindo que este fato ocorreu devido à alta irrigação que proporcionou maior proteção aos conídios, movendo-os para mais baixo no solo e mantendo-os longe de fatores abióticos que contribuem para mortalidade conidial, como a elevada temperatura e a luz UV.

Fernandes et al. (2007) enfatizaram que uma importante característica dos fungos para ser usado em controle biológico de pragas inclui ter alta virulência contra o inseto alvo e também alta capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro. Deste modo, os autores mostraram que entre 53 isolados de *B. bassiana* expostos à luz UV-B por 2h, apenas cinco puderam ser consideradas como bons tolerantes (50 a 80% de germinação).

Huang & Feng (2009) desenvolveram um método de modelagem para avaliar doses letais de radiação UV-B contra *B. bassiana*, denominado Bio-Sun⁺⁺ System. Neste método, a fonte de radiação é controlada por um multiprocessador que gera comprimentos de onda UV-B-dose específico. Mostraram que esse método foi mais rápido em emitir a radiação do que o método tradicional que usa várias horas de exposição do fungo a fontes de UV-B. Deste modo, a avaliação do efeito deletério da radiação sobre as linhagens seria mais exata e a seleção de tolerantes, mais rápida.

Ottati-de-lima et al., (2010) analisando o efeito da radiação UV sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, observaram que 25 segundos foram suficientes para baixar o índice de germinação dos conídios de *B. bassiana* produzidos em arroz de 97,08% para

32,67%. Também observaram que os conídios deste fungo quando expostos 50 segundos às radiações foram mais resistentes do que os de *M. anisopliae*. Devido à variabilidade natural existente entre as espécies, sugeriram que as mais resistentes fossem utilizadas em programas de melhoramento para o controle microbiano.

3.4.2 Fatores Bióticos

Em relação aos fatores bióticos que afetam diretamente os patógenos, Alves & Lecuona (1998) citam como mais importantes a reprodução, disseminação, vias de inoculação, transmissão, capacidade de sobrevivência, potencial do inóculo, infectividade, patogenicidade e virulência.

A transmissão de um patógeno, ou seja, a passagem deste de uma fonte de inóculo ou de um hospedeiro infectado para outro sadio pode ser do tipo horizontal ou vertical, ocorrendo de maneira direta ou indireta com a ajuda de agentes de disseminação do ambiente. Na horizontal, o patógeno é transmitido de inseto para inseto, já na vertical o patógeno é disseminado pelos ovos de maneira hereditária (ALVES & LECUONA, 1998). A viabilidade da transmissão horizontal representa uma nova oportunidade para programas de manejo integrado de pragas (TOLEDO et al., 2007) e oferece algumas vantagens como a redução da quantidade do inóculo e da área tratada com o fungo, minimizando assim, efeitos adversos em organismos não-alvo (QUESADA-MORAGA, et al., 2008).

Em experimentos de transmissão de *B. bassiana* entre adultos e larvas da traça das crucíferas, Furlong & Pell (2001) testaram várias estratégias de disseminação do patógeno e evidenciaram que adultos da traça podem transportar efetivamente o fungo

de um substrato para outros indivíduos ou ainda adquirir doença através do contato com insetos infectados.

Rossi (2002), avaliou dois aspectos da transmissão de *Hirsutella* sp. entre indivíduos de *Brevipalpus phoenicis* Geijskes. No primeiro experimento, cadáveres de ácaros mortos pelo fungo foram misturados a ácaros vivos; no segundo, ácaros vivos entraram em contato com substrato inoculado com diferentes suspensões de *Hirsutella* sp. Após cinco e sete dias do contato de ácaros vivos com cadáveres, a mortalidade foi de 88% e 93%, respectivamente. Na segunda situação, ocorreu a transferência do fungo independente da concentração utilizada.

Foi avaliado o efeito da esporulação, virulência e temperatura na transmissão de *M. anisopliae* e *B. bassiana* nas colônias do cupim, *Coptotermes formosanus* Shiraki. Para os isolados de *M. anisopliae*, a esporulação foi mais importante do que a virulência na produção de epizootias, fato que não foi observado com os isolados de *B. bassiana*. Isto indica que nesta espécie, outras características podem desempenhar um papel decisivo nas epizootias e mais estudos são necessários (SUN et al., 2003).

O potencial de transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos também foi demonstrado por Toledo et al. (2007). Nesta pesquisa, machos infectados de *A. ludens* foram capazes de infectar fêmeas durante a cópula e causar mortalidade de 80,6%, além de reduzir drasticamente a fertilidade e a fecundidade das mesmas.

Quesada-Moraga et al. (2008) avaliaram em um dos seus experimentos a eficiência de transmissão horizontal de *M. anisopliae* entre adultos de *C. capitata*, usando uma armadilha impregnada com o fungo. A mortalidade de machos e fêmeas da mosca que entraram em contato com o dispositivo foi de 100%; fêmeas infectadas que

copularam com machos sadios, transmitiram o fungo e causaram mortalidade de 90%. Os autores ressaltam a importância da capacidade de transmissão a partir de armadilhas, pois também estaria minimizando o efeito do fungo em organismos não-alvo, além de ter a vantagem dos adultos infectados alcançarem outros indivíduos em lugares onde há dificuldade de utilizar aplicações convencionais de inseticida.

García-Munguía et al. (2011) estudaram pela primeira vez a transmissão de *B. bassiana* entre machos e fêmeas de *Aedes aegypti* L. por meio da copulação. Os autores revelaram que o fungo foi eficiente e causou mortalidade de 90% em 15 dias. Os efeitos da contaminação também foram vistos na fecundidade, que foi diminuída em 95% em relação ao grupo controle.

3.5 Enzimas degradadoras de cutícula

A cutícula dos insetos é formada por uma delgada epicutícula, constituída de proteínas e lipídios, cobrindo uma compacta procutícula que é composta por microfibrilas de quitina (polímeros de *N*-acetilglicosamina) embebidas em proteína (Figura 8).

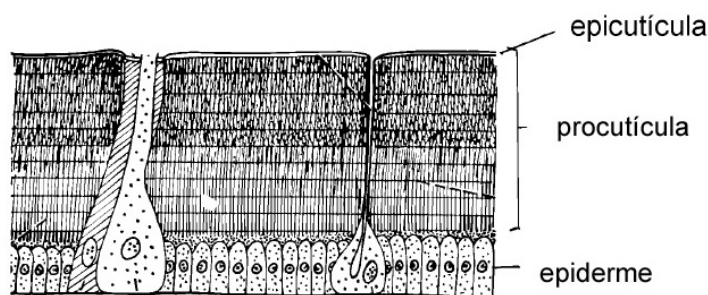


Figura 8: Esquema da cutícula de um inseto.

Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br

Esta cutícula forma uma barreira contra organismos que não possuem um mecanismo ativo para sua penetração (vírus, bactérias e protozoários). Apenas os fungos entomopatogênicos podem invadir seus hospedeiros através da cutícula, rompendo essa barreira por ações mecânicas e enzimáticas (ST. LEGER, 1995).

Moino Jr. et al. (2002) descreveram o desenvolvimento externo de *B. bassiana* sobre o cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* Hagen e segundo estes autores, após a aplicação do fungo, os conídios aderiram na cutícula do hospedeiro de 0 a 6h. O início da germinação ocorreu entre 12 e 48 horas, após a inoculação, quando foi observada a presença de halos ao redor dos conídios. A ocorrência desses halos parece estar relacionada com a produção e excreção de enzimas por entomopatógenos, durante o processo infectivo. A combinação de enzimas proteolíticas e quitinases produzidas pelo micélio fúngico, digerem a cutícula do inseto, facilitando a penetração do tegumento do inseto. A extrusão micelial aconteceu entre 96h e 120h após a inoculação, principalmente nas áreas intersegmentais, e mais tarde nas áreas com reforço de cutícula, induzindo a completa degradação da mesma.

Os fungos entomopatogênicos apresentam vários determinantes de patogenicidade, incluindo a produção de enzimas degradadoras de cutícula, tais como, proteases, quitinases e lipases (ST. LEGER, 1995). Essas enzimas são referidas como responsáveis pelo início da infecção, já que hidrolisam complexos poliméricos de proteínas e quitinas, os maiores constituintes da cutícula do inseto (GABRIEL, 1968). A hidrólise da quitina é feita por dois tipos de enzimas que agem sinergicamente, a quitinase e a β -n-acetilhexosaminidase (FENICE et al., 1998).

O melhor modelo de determinante de patogenicidade em fungos entomopatogênicos é baseado em uma endoprotease do tipo-subtilisina, denominada Pr1, estudada pela primeira vez em *M. anisopliae* por ST. Leger (1988). A enzima do tipo-tripisina (Pr2), pertencente ao grupo das serino proteases, também é produzida por estes fungos e ocorre durante os estágios iniciais da colonização da cutícula, sugerindo um importante papel na degradação extracelular de proteínas, complementar ao da Pr1 (ST. LEGER et al., 1996).

Bidocka & Khachatourians (1987) realizaram um dos primeiros trabalhos sobre proteases degradadoras de cutícula produzidas por *B. bassiana*. Na ocasião, purificaram uma protease extracelular de 35kDa, com atividade ótima em pH 8,5 e temperatura ótima entre 37 e 42°C, sendo rapidamente inativada a 60°C. A mesma foi inibida pelo fluoreto de fenilmetil-sufolnil (PMSF), indicando que um resíduo de serina estava presente no sítio ativo da enzima.

Shimizu et al. (1992) em experimentos com *B. bassiana*, purificaram uma protease extracelular com peso molecular de 32kDa com atividade ótima em pH 9,5. Esta enzima também foi inibida pelo PMSF, sendo classificada como serino protease. Ao avaliarem a produção enzimática em três diferentes meios de cultura, constataram que a produção da enzima foi maior no meio contendo cutícula de *Bombyx mori* do que no meio onde a fonte de carbono era gelatina. Comparando estes dados com os de Bidocka & Khachatourians (1987), poucas diferenças se revelam quanto à estabilidade e peso molecular da enzima, contudo estes resultados podem ocorrer devido à variabilidade natural das linhagens.

O papel da Pr1 e da Pr2 também foi estudado por Paterson et al. (1994), que revelaram que as proteínas presentes na cutícula do inseto parecem induzir a produção de Pr1 por *M. anisopliae*. Chegaram a esta conclusão, ao verificarem que os níveis de Pr1 foram reduzidos quando o fungo cresceu em cultura com cutícula desproteínada. Verificaram ainda que a Pr2 estaria envolvida na ativação ou indução da Pr1.

Gillespie et al. (1998) investigaram a habilidade da Pr1 de *Metarhizium* spp. ao degradarem diversos tipos de cutícula, oriundas de diferentes partes de duas espécies de inseto. Pelo fato das regiões do corpo do inseto possuir diferenças na composição de proteínas e no grau da esclerotinização, houve diferença significativa na produção enzimática. O isolado ARSEF 727 liberou 3,7 vezes mais proteína na cutícula da região abdominal do que da asa, contudo todos os isolados foram capazes de degradar todos os tipos de cutícula, mostrando que a enzima é ampla o suficiente para se adaptar as diferenças nas sequências das proteínas da cutícula.

Uma protease extracelular designada BBP (*Beauveria bassiana* protease) foi purificada e caracterizada por Urtz & Rice (2000). Esta enzima foi produzida nos estágios tardios do crescimento fúngico em meio contendo gelatina, sendo inibida por PMSF e quimostatina, desse modo foi classificada pelos autores como sendo uma serino-protease com atividade tipo quimotripsina. A protease foi estável a 25°C e teve um pH ótimo alcalino (7,5-9,5). Outra protease foi purificada do mesmo isolado e identificada como uma protease tipo subtilisina (Pr1). Uma análise comparativa entre as duas, revelou que BBP tem um ponto isoelétrico menor (pI 7,5) do que o da Pr1 (≥ 10) e apresenta também um menor peso molecular (0,5kD). Entretanto, as duas proteases têm igual atividade degradadora de cutícula, embora BBP seja sintetizada anteriormente a Pr1.

Segundo ST. Leger et al. (1986), a secreção de enzimas acontece de modo seqüencial, aparecendo inicialmente as proteases seguidas pelas quitinases. Observaram que o pré-tratamento da cutícula com proteases aumentou consideravelmente a produção de quitinase. Havukkala et al. (1993) induziram a produção de uma quitinase produzida por *B. bassiana* em meio de cultura líquido com adição de quitina coloidal (1%) e a partir deste meio purificaram uma enzima de massa molecular de 45kDa.

Em estudos com *M. anisopliae*, *M. flavoviride* Gams & Rozsypal (= *M. anisopliae* var. *acridum*) e *B. bassiana*, foi observado que estes fungos produziram um complexo quitinolítico que pode ser dividido em ácido e básico, de acordo com seu ponto isoelétrico ou com a especificidade do substrato. As enzimas produzidas após quatro dias de crescimento foram purificadas e revelaram peso molecular de 43,5 e 45 kDa. Imagens de microscopia eletrônica da cutícula de larvas de *Manduca sexta* L. tratadas com anticorpo anti-quitinases e infectadas pelos três fungos, revelaram aumento significativo da atividade da quitinase em regiões internas da cutícula, coincidentes com locais previamente degradados por proteases, sugerindo a ação complementar destas enzimas na solubilização da cutícula e penetração no fungo (ST. LEGER et al., 1996).

Uma quitinase de peso molecular de aproximadamente 60 kDa foi detectada em cultura sobrenadante de *M. anisopliae* cultivado em meio líquido contendo quitina como única fonte de carbono. O pH ótimo foi de 5,0 e o peso molecular é diferente dos valores anteriormente publicados para quitinases (33; 43,5 e 45 kDa) (KANG et al., 1999).

Tiago et al. (2002) investigaram a produção de Pr1 e Pr2 por *M. flavoviride* crescido na presença e ausência da cutícula de *Schistocerca pallens* Thunberg, e sua distribuição nas frações intracelular e secretada. Os resultados mostraram que a produção de Pr1 ocorreu apenas em meio contendo cutícula. Diferentemente, Pr2 foi detectada em ambos os meios, tendo maior produção no meio sem cutícula, mostrando o efeito inibidor da cutícula. A atividade das enzimas foi maior na fração secretada, sugerindo a ocorrência de um eficiente mecanismo de secreção de proteínas por este fungo.

Shubakov & Kucheryavkh (2004) quando testaram a capacidade de nove espécies fúngicas, incluindo *B. bassiana*, em produzir quitinase em meio líquido contendo quitina coloidal, observaram que todas elas foram capazes de utilizar este substrato. Contudo, quando os fungos foram cultivados em meio contendo apenas glicose, como fonte de carbono, não foi detectada atividade enzimática. Aparentemente, porque as quitinases são enzimas induzidas. Por outro lado, quando *B. bassiana* foi cultivada contendo os dois substratos (quitina coloidal e glicose), a produção aumentou de 2,4 para 3,8 U/mg de proteína.

Campos et al. (2005) estudaram a produção de proteases e quitinases por *B. bassiana* e *B. amorpha* durante seu crescimento em meio contendo fontes simples ou complexas de carbono e também em meio com cutícula do carrapato *Boophilus microplus* Canestrini. O maior nível de atividade foi encontrado no meio contendo quitina e cutícula. Já a glicose e o aminoácido alanina inibiram a secreção das enzimas.

A produção de Pr1 e Pr2 por *B. bassiana* foi avaliada por Dias et al (2008) na presença e ausência da cutícula da broca do café, *Hypothenemus hampei*, em condições

tamponadas e não tamponadas. Os autores mostraram que em meio não tamponado os valores de Ph das culturas diminuíram e a atividade foi detectada somente quando o pH foi acima de 5,5. A atividade enzimática foi maior nos meios tamponados, demonstrando que o pH do cultivo é determinante na expressão dessas enzimas. Os resultados revelaram ainda, que a atividade foi maior quando a cutícula estava presente no meio.

Sassá et al. (2008) estudaram os parâmetros cinéticos de pH, temperatura, concentração iônica e tempo de reação sobre a atividade de quitinases produzida por *B. bassiana*. As quitinases foram isoladas e concentradas por ultrafiltração entre membranas de 10 e 100kDa sob pressão de nitrogênio. A atividade enzimática foi máxima a 45°C, em pH 5,5, mas também foi elevada em pH 6,0 e 8,5 em concentração iônica de 50mM. A atividade de quitinases aumentou durante uma hora de incubação demonstrando estabilidade das enzimas nas condições ótimas da reação.

Ferrari (2008) analisou a produção e a regulação da Pr1 de *B. bassiana* em meio contendo cutícula do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*. A PCR Real-time revelou que o nível de expressão do gene *Pr1Bb* em 12 horas após a inoculação em meio contendo cutícula foi aproximadamente 32 vezes maior do que em meio sem cutícula. No meio contendo metionina (0,5%) um elevado nível de Pr1 foi observado e o nível da expressão do gene foi 6 vezes maior do que o meio contendo apenas nitrato. Contudo, no meio contendo cutícula, a adição de metionina inibiu a expressão do gene. Deste modo, os autores sugerem que o gene *Pr1Bb* é regulado por componentes da cutícula do gafanhoto e pelo aminoácido metionina.

Donatti et al. (2008) estudaram a influencia de diversos aminoácidos na secreção de Pr1 e Pr2 e observaram que os menores valores de atividade enzimática ocorreram na presença dos aminoácidos L- alanina, prolina e glicina, enquanto que em presença de metionina, a produção foi estimulada. O sobrenadante contendo glucose e D-alanina revelou atividade intermediária. A metionina mostrou ter um papel regulatório na secreção dessas enzimas, apesar de ocorrer em pequenas quantidades ou estar ausente na cutícula de artrópodes.

Com o objetivo de avaliar os mecanismos de indução e repressão da atividade quitinolítica, 17 isolados de *B. bassiana* foram cultivados em quatro diferentes meios de cultura contendo várias fontes de carbono e nitrogênio. A atividade variou entre os meios e entre os isolados. A maior atividade foi observada em meio com quitina coloidal como única fonte de carbono seguida pelo meio contendo extrato de levedura, uma fonte extra de nitrogênio. Uma quitinase de peso molecular de 70 kDa foi purificada da maioria dos isolados (DHAR & KAUR, 2010)

Alguns trabalhos têm descrito a relação entre produção de enzimas degradadoras de cutícula e virulência dos entomopatógenos. Gupta et al. (1994) demonstraram que houve correlação entre a produção de quitinase e Pr1 produzidas por diferentes linhagens de *B. bassiana* e a virulência contra *Galleria mellonella* e *Trichoplusia ni*. Observaram que altos níveis destas enzimas foram obtidos por linhagens com menor tempo letal.

Fang et al. (2005) purificaram uma quitinase à partir da cultura líquida de *B. bassiana* crescida em meio contendo quitina coloidal e clonaram o gene *Bbchit1*. Linhagens transformantes de *B. bassiana* que demonstraram super produção dessa

quitinase tiveram sua virulência contra pulgões (*Myzus persicae* Sulzer) significativamente aumentada. Posteriormente, Fang et al. (2009) construíram um gene de fusão, compreendendo o *Bbchit1* e o gene *cdep1* (gene da protease degradadora de cutícula Pr1) de *B. bassiana*. Os autores observaram que os transformantes do fungo que possuíam o gene de fusão degradaram a cutícula do inseto mais rapidamente do que as linhagens que possuíam os genes isolados. Comparado com a linhagem selvagem, o transformante que super expressava *cdep1* mostrou 12,5% de redução no tempo letal médio (TL₅₀), sem redução da concentração letal (CL₅₀). Já as linhagens que possuíam o gene de fusão reduziram o TL₅₀ em 24,9% e o CL₅₀ em 60,5%. Além disto, este estudo reforça a idéia de que proteases e quitinases agem sinergicamente para degradar a cutícula do hospedeiro.

Nunes et al. (2010) avaliaram a produção de Pr1 e Pr2 por duas linhagens do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* e sua correlação com a patogenicidade contra *Anticarsia gemmatilis*. O crescimento do fungo foi realizado em meio mínimo contendo nitrato e suplementado com a cutícula ou exúvia de *A. gemmatilis*, ou com substrato não cuticular. Em meio contendo nitrato, nenhuma atividade de Pr1 foi detectada nos sobrenadantes das culturas. Entretanto, houve produção em meio suplementado com fonte exógena de nitrogênio e na presença da cutícula do inseto. A atividade de Pr2 foi inferior à atividade de Pr1. A linhagem NR458 causou maior mortalidade das lagartas (64,4%) e teve a maior produção de Pr1, sugerindo uma correlação positiva para essas variáveis.

Após crescimento de *B. bassiana* em cultura líquida, seu sobrenadante foi coletado e utilizado em estudos virulência e produção de Pr1 e quitinase. Os resultados mostraram que o sobrenadante reduziu a população dos pulgões do algodão (*Aphis*

gossypii Glover) e foi dose-dependente. Imagens de microscopia eletrônica mostraram que a cutícula dos pulgões tratada com o sobrenadante foi substancialmente degradada. Foi detectada a produção de enzimas no sobrenadante e experimentos com inibidores enzimáticos mostraram que a atividade aficida diminuía à medida que eram adicionados ao sobrenadante. Sobrenadante sem inibidores mostraram 77% de eficácia contra os pulgões, enquanto sobrenadante com inibidor de quitinase mostrou 7,4% de controle. Esta pesquisa revela que estas enzimas estão fortemente envolvidas na atividade aficida de *B. bassiana* (KIM et al. 2010).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOD, F.; BAJWA, G.A.; IBRAHIM, Y.B.; SAJAP, A.S. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against the Tiger Moth, *Atteva sciodoxa* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Entomology**, v.7, p 19-32, 2010.

ALAM, M.M.; BENNET, F.D.; CARL, K.P. Biological control of *Diatraea saccharalis* (E) in Barbados by *Apanteles flavipes* Cam. and *Lixophaga diatraeae* T. T. **Entomophaga**, v. 16, p.151-158, 1971.

ALEXANDRE, T.M. ; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H.; ALVES, L.F.A. Controle associado de *Alphitobius diaperinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e inseticidas químicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, p.481-489, 2008.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.

ALMEIDA, L.C.; PRECETTI, A.T.C.M; JÚNIOR, P.K.; FURTADO, C.R.; PINEGONE, L.M.; ZAMBONATTO, M.M. Avanços na produção massal da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e seus parasitóides. **Boletim Técnico Copersucar**, v.44, p.14-21, 1988.

ALVES, S.B.; PÁDUA, L.E.M.; A ZEVEDO, E.M.V.M.; A LMEIDA, L.C. Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.403-406, 1985.

ALVES, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p. 289- 381. In ALVES, S.B. (ed.), **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E., 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p. 97-170. In: ALVES. S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ. 1163 p.

ALVES, S.B.; ROSSI L.S.; LOPES, R. B.; TAMAI, M.A.; PEREIRA, R.M.. *Beauveria bassiana* yeast phase on Agar médium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 81, p. 70-77, 2002.

ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUES, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VALÁZQUEZ, W.P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological states of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, v. 5, p. 1-8, 2005.

ARAÚJO JR, J.M. de; MARQUES, E.J.; OLIVEIRA, J.V. de. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de Nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical entomology**, v. 38, p. 520-225, 2009.

BARRIGOSI, A.F.; CASTRO, E.M. DE.; SANTOS, A.B dos.; FERREIRA, E.J. Perdas de produção pela broca-do-colmo (*Diatraea saccharalis* Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em genótipos de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, p. 99-103, 2004.

BENHAM, R.W.; MIRANDA, J.L. The genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling borers. **Mycologia**, v. 45, p.727-745, 1953.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1679-1684, 1987.

BOIÇA JÚNIOR A.L.; LARA, F.M; BELLODI, M.P. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cam.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 537-542, 1997.

BORTOLI, S.A.; DORIA, H.Q.S.; ALBERGARIA, N.M.M.S.; BOTTI, M.V. Biological aspects and damage of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in sorghum, under different doses of nitrogen and potassium. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 267-273, 2004.

BOTELHO, P.S.M. Quinze anos de controle biológico de *Diatraea saccharalis* utilizando parasitóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 255-262, 1992.

BOUAMAMA, N.; VIDAL, C.; FARGUES, J. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.105, p. 139-44, 2010.

BOX, H.E. The crambine genera *Diatraea* and *Xantoperne* (Lep., Pyral.). **Bulletin of Entomological Research**, v. 22, p.1-50, 1931.

BRAGA, G.U.; 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 degrees N to 54 degrees S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.98-108, 2001.

BRAGA, G.U.; RANGEL, D.E.; 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**, v. 94, p. 912-920, 2002.

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; PEREIRA-BARROS, J.L.; SANTOS, A.J.N.; CARVALHO, L.W.T.; CARVALHO, L.H.L.; OLIVEIRA, C.J.T. Efeito do número de adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados em semanas sucessivas, para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 53-58, 2007.

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

BUSTILLO, A.E.; CÁRDENAS, R.; POSADA, F.J. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 35-639, 2002.

CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.V.DA; BARROS, N.M.DE.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. **Current Microbiology**, v. 50, p. 257–261, 2005.

CAMPOS, M. B. S.; MACEDO, N. Cana-de-açúcar - Ampliando campo de ataque. Cultivar; **Grandes Culturas**, Pelotas, v. 6, p. 23-26, 2004.

CIB (Conselho de informações sobre biotecnologia). **Guia da cana-de-açúcar.**

Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf> Acesso em: 30 nov. 2010.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira.** Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>

Acesso em: 03 jan. 2012.

CRUZ, I. 2007. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. EMBRAPA-CNPMS, **Circular técnica**, v. 90, 12p.

DE HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, v.1, p.1-39, 1972.

DE LA ROSA, W.; LOPEZ, F.L.; LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 36-43, 2002.

DEPIERI, R.A; MARTINEZ, S.S.; MENEZES Jr., A.O. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 601-606, 2005.

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

DIAS, B.A.; NEVES, P.M.O.J; FURLANETO-MAIA, L; FURLANETO, M.C. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 301-306, 2008.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **BioControl**, v. 49, p. 83–94, 2004.

DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S.A.; EKESI, S.; MUEKE, J.K. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera :Tephritidae). **Mycopathologia**, v. 156, p. 375-382, 2003.

DONATTI, A.C.; FURLANETO-MAIA, L.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO, M. C. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. **Current Microbiology**, v. 56, p. 256–260, 2008.

ESTRADA, M.E.; ROMERO, M.; RIVERO, M.J.; BARROSO, F. Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 42-43, 2004.

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application to Improve Fungal Strain Virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 363–370, 2005.

FANG, W.; FENG, J.; FAN, Y.; ZHANG, Y.; BIDOCHKA, M.J.; ST. LEGER, R.J.; PEI, Y. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 155–159, 2009.

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

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogêncios no Brasil. Situação atual e perspectivas. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, v. 22, p. 18-21, 2001.

FENICE, M.; GIAMBATTISTA, R.D.; PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, F. Production of NAcetyl-D-Glucosamine and Chitinolytic Enzymes by a Strain of *Verticillium lecanii* Cultivated in Bench-top Fermentor. **Advance in Chitin Science**, v. 2, p. 145-150, 1998.

FERNANDES, E.K; RANGEL, D.E.; MORAES, A.M.; BITTENCOURT, V.R.; ROBERTS, D.W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237-43, 2007.

FERRARI, L.B. **Regulação da produção de subtilisinas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. 2008. 68f. Dissertação. Universidade Federal de Londrina, Londrina, 2008.

FOLEGATTI, M.E.G. **Interação entre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., 1883 e os principais parasitóides da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794)**. 1985. 102f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FURLONG, M. J.; PELL. J. K. Horizontal transmission of entomopathogenic fungi by the diamondback moth. **Biological Control**, v. 22, p. 288–299, 2001.

GABRIEL, B.P. Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. **Journal invertebrate pathology**, v. 11, p. 70-81, 1968.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 920p. 2002.

GARCÍA-MUNGUÍA, A.M.; GARZA-HERNÁNDEZ, J.A.; REBOLLAR-TELLEZ, E.A.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A.; FILIBERTO REYES VILLANUEVA, F.R. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v.4, p.1-6, 2011.

GILLESPIE, J.P.; BATEMAN, R.; CHARNLEY, A.K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 128-137, 1998.

GIUSTOLIN, T.A.; VENDRAMIM, J.D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, E.S.A. Efeito Associado de Genótipo de Tomateiro Resistente e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* Meyrick (Lep., Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 30,p. 461-465, 2001.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. 2000. Fungi. pp. 255–282. In: LACEY, L.A., KAYA, H.K. (Eds.). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 485p.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria basiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 13-17,1994.

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

HAVUKKALA, I.; MITAMURA, C.; HARA, S.; HIRAYAE, K.; NISHIZAWA, Y.; HIBI, T. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 97- 102, 1993.

HICKS, B.J.; WATT, A.D.; COSENS, D. The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Forest Ecology and Management**, v. 149, p. 275-281, 2001.

HOWARD, L.O. The larger corn stalk borer (*Diatraea saccharalis* F.). **Insect Life**, v. 4, p. 95-103, 1891.

HUANG, B.F.; FENG, M.G. Comparative Tolerances of Various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B Irradiation with a Description of a Modeling Method to Assess Lethal Dose . **Mycopathologia**, v.168, p. 145-152, 2009.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D. L.; GOETTEL, M. S. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. **Biological Control**, v. 7, p.131–139, 1996.

KANG, S.C.; PARK, S.; LEE, D.G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.276-281, 1999.

KAUR, G.; PADMAJA, V. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 299-307, 2008.

KIM, J.S.; ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; WANG, Y.; SHIM, H.J.; JE, Y.H. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. **Fungal Biology**, v. 114, p. 120-128, 2010.

LEKIMME, M.; FOCANT, C.; FARNIR, F.; MIGNON, B.; LOSSON, B. Pathogenicity and thermotolerance of entomopathogenic fungi for the control of the scab mite, *Psoroptes ovis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 95-104, 2008.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 71, p.35-40, 2004.

LORD, J. C. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribolium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. **Journal Applied Entomology**, v. 133, p. 101–107, 2009.

LOZANO-GUTIÉRREZ; ESPAÑA-LUNA, M.P. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the White Grub *Laniifera cyclades* (Lepidoptera: Pyralidae) under Field and Greenhouse Conditions. **Florida Entomologist**, v. 91, p: 664-668, 2008.

LUNA-ALVES LIMA E. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 84, suplemento III, p. 17-20, 1989.

LUZ, C.; FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of the an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. **Mycopathologia**, v. 138, p. 117-125, 1997.

MACEDO, N. **Praga da cana-de-açúcar**. Disponível em: <[http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/b2aaf15da221a95785256a6d006d7a23/85e196c5b7a17cb1032570d800458848/\\$FILE/Palestra%20Newton%20Macedo.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/b2aaf15da221a95785256a6d006d7a23/85e196c5b7a17cb1032570d800458848/$FILE/Palestra%20Newton%20Macedo.pdf)> Acesso em: 03 Dez. 2010.

MACLEOD, D.M., Investigations on the genera *Beauveria* Vuill and *Tritirachium* limber. **Canadian Journal of Botany**, v. 32, p. 818-893, 1954.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B.; MARQUES, M.R.I. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p. 303-307, 2000.

MARQUES, R.P; MONTEIRO, A.C; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, p. 1675-1680, 2004.

MARUCCI, R. **Controle biológico da broca-da-cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1247>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

MAPA. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 19 mar. 2010.

MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, v. 114, p. 49-56, 2010.

MOINO JR., A.; ALVES, S.B.; LOPES, R. B.; NEVES, P.M.O.J.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S.A. external development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 267-273 , 2002.

NEVES, P.M.O.J; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 77-82, 2005.

NUNES, A.R.F.; MARTINS, J.N.; FURLANETO, M.C.; BARROS, N.M. de. Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatilis*. **Ciência Rural**, v.40, p. 1853-1859, 2010.

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

ONOFRE, S.B; VARGAS, L.R.B.; ROSSATO, M.; BARROS, N.M.; BOLDO, J.T.; NUNES, A.R.F.; AZEVEDO, J.L. Controle biológico de pragas na agropecuária, por meio de fungos entomopatogênicos, p. 295-317. In: L.A. SERAFINI; N.M. BARROS; J.L. AZEVEDO (Eds.) Biotecnologia: **Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, EDUCS, Caxias do Sul, 452p. 2002

OTTATI-DE-LIMA, E.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M ; GASSEN, M.H.; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, A.M.B. DE ; ZAPPELLINI, L.O. Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.651-659, 2010.

PARRA, J.R.P. 1993. Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.M. de; OLIVEIRA, E.A.M. de. (eds.). **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, FEALQ, p.184-197.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. p. In: (eds.). **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. Barueri, Manole, 2002. 609p.

PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M.; CLARKSON, M. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v.140, p.3153-3159, 1994.

PINTO, A. de S. **Controle de Praga da Cana-de-Açúcar**. Boletim Técnico Biocontrol n. 1, 2006. 64 p.

PORTELA-SILVA, APA. **Infectividade de *Metarhizium anisopliae* à *Zaprionus indianus* (mosca-do-figo) sob condições de laboratório**. 2007. 50f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A.C.; GARCIA, M.V.; SOARES, V.E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 855-861, 2005.

QUESADA-MORAGA, E.; MARTIN-CARBALLO, I.; GARRIDO-JURADO, I.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 47, p. 115–124, 2008

RANGEL, D.E.; BRAGA, G.U.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p.116-125, 2005.

REDDY, N.P.; ALI KHAN, A.P.; DEVI, U.K.; SHARMA, H.C. REINEKE, A. Treatment of millet crop plant (*Sorghum bicolor*) with the entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) to combat infestation by the stem borer, *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 12, p. 221–226, 2009.

ROSSI, L.S. Seleção de fungos entomopatogênicos e infecção de *Hirsutella* sp. em *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939). **2002. 92f. Dissertação. ESALQ, Piracicaba, 2002.**

ROSSETTO, R., SANTIAGO, A. D. **Pragas**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_53_711200516718.html> Acesso em: 03 fev. 2011.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. Two new *Beauveria* spp. from south America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.93-97, 1982.

SANCHEZ-PEÑA, S.R. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. **Biocontrol**, v. 45, p. 63–78, 2000.

SASSÁ, D.C.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T.; NEVES, P.M.O.J.; WU, J.I.; SUGAHARA, V.H.; MITA, C.; KAMOGAWA, E. Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 807-814, 2008.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E. NÓBREGA, J. C. M. (Eds.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, ESALQ, 2006, p. 19-36.

SHIMIZU, S.; TSUCHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Purification and properties of an extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Journal of Sericultural Science of Japan**, v. 61, p. 421–428, 1992.

SHUBAKOV, A.; KUCHERYAVYKH, P.S. Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 445–447, 2004.

SILVA, V.C.A.; BARROS, R.; MARQUES, E. J.; TORRES, E.J.B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos Fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 653-658, 2003.

ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.167-177, 1986.

ST. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 285-293, 1988.

ST. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.1119-1125, 1995.

ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.

SUN, J.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, p. 38-46, 2003.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LIU, Z.; MA, M.; GOU, H.; CHEN, Z.; LI, Y.; LIU, A.; NIU, Q.; YANG, J.; YIN, H.; LUO, J.; Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 25, p. 389-93, 2011.

SVEDESE, V.M. Suscetibilidade de *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. 2007. 55f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco.

TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO, M.C. Cuticledegrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. **Letters Applied Microbiology**, v. 34, p. 91-94, 2002.

TEFERA, T.; PRINGLE, K.L. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.84, p. 90–95, 2003.

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

TOLEDO, J.; CAMPOS, S.E.; FLORES, S.; LIEDO, P.; BARRERA, J.F.; VILLASENOR, A.; MONTOYA, P. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in the Mexfly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), under laboratory and field-cage conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 291-297, 2007.

TRUMPER, E.V.; PORELLO, L.; SERRA, G. Relación entre posición de desoves Del barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*) y distribución de daños en plantas de maíz. **INTA, Información Técnica**, v.1, p. 23-29, 2004.

UNICA. **Setor Sucroenergético - Mapa da Produção**. Disponível em:

<<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode={D6C39D36-69BA-458D-A95C-815C87E4404D}>> Acesso em: 30 out. 2010.

URTZ, B.E.; RICE, W.C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v.104, p.180-186, 2000.

VANDENBERG, J.D.; RAMOS, M.; ALTRE, J.A. Dose-response and age and temperature related susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). **Environmental Entomology**, v. 27, p. 1017-1021, 1998.

VILAS BÔAS, A.M.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria* spp. e seu efeito associado ao inseticida monocrotofós sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castniidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 17, p. 305-332, 1988.

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

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, S.T.; VANDENBERG, J.D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 186–199, 2010.

XIAO-MU MA; XIAO-XIA LIU; XIA NING; BO ZHANG; FEI HAN; XIU-MIN GUAN; YUN-FENG TAN; QING-WEN ZHANG. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae) **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, p. 123–128, 2008.

CAPÍTULO 1

Effect of Exposure Method to *Beauveria bassiana* and Production of Cuticle-Degrading Enzymes in the Presence of *Diatraea saccharalis* Cuticle

Virgínia Michelle Svedese^a, Patrícia Vieira Tiago^a, Elza Áurea de Luna Alves Lima^a,

Ana Lúcia Figueiredo Porto^{*b}

Artigo submetido ao Journal Applied of Entomology

* Corresponding author. Fax number: +55 81 3320-6388

E-mail address: analuporto@yahoo.com.br

Abstract- The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, is one of the worst pests in Brazilian sugarcane crop, causing high levels of financial losses every year. *Beauveria bassiana* is an entomopathogenic fungus widely used in the biological control of several agricultural pests. In this study was investigated the impact of three different fungal inoculation methods on insect mortality. Was also measured *B. bassiana*'s capacity to produce subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like proteases (Pr2) and chitinases in the presence and absence of sugarcane borer cuticle. The *Beauveria bassiana* strains tested, URM2915, URM2921 and URM3447 presented the highest mortality rates. The dip and conidial spray methods led to high mortality rates (70-91%), whereas larvae fed with stalks infected with the fungal suspension had mortality levels varying between 26 and 42%. The production of enzymes was higher in the medium containing cuticle, showing that the process is stimulated by specific components found in the cuticle of the host. Pr1 activity was higher than Pr2 and both were produced at 24h. The highest production of chitinase was obtained at 96h of culture for all strains tested. Levels of specific cuticle-degrading enzymes such as proteases and chitinase correlated positively with specific virulence parameters.

Keywords: biological control, sugar cane, pathogenicity, subtilisin-like protease, trypsin-like protease and chitinase.

1. Introduction

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is an important source of sugar and alcohol in the Brazilian economy. However, part of the crop is lost due to the action of a number of insect pests, of which the borer *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) is one of the most important (Gallo 2002). Due to its cryptic lifestyle, conventional control measures by deploying chemical insecticides targeted at the larvae are ineffective.

An alternative to chemical control is the use of entomopathogenic fungi, such as *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. These fungi are widely used as biocontrol agents for a number of insect pests (Lacey 2001; Hajek and Delalibera Jr 2010) and the efficiency of *B. bassiana* has already been proven against a number of lepidopterae, such as *Castnia licus* Drury (Alves et al. 2002), *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lewis et al. 2002), *Plutella xylostella* L. (Silva et al. 2003), *Spodoptera frugiperda* Smith (Vijayavani et al. 2009) and *Thaumetopoea pityocampa* Den. & Schiff (Sevim et al. 2010). However, as reported by Tefera and Pringle (2003a), the host mortality rate depends on the method of exposure to the pathogen used, a fact that must be taken into account in screening the appropriate strains for the target insect.

Entomopathogenic fungi have a number of determinants of pathogenicity, including production of cuticle-degrading enzymes, such as proteases, chitinases and lipases (Bidochka and Khachatourians 1987). These enzymes are pointed out as the responsible for infection, since they have already hydrolyzed polymer protein and chitin complexes, the major components of the insect's cuticle (ST. Leger et al. 1986). The best model to determining the level of pathogenicity in entomopathogenic fungi is

based on an endoprotease of the subtilisin-like, called Pr1, first studied in *M. anisopliae* by St.Leger (1988). A trypsin-like enzyme (Pr2) belonging to the serine protease group also occurs during the early stages of cuticle colonization suggesting that it plays a role in degrading extracellular proteins complementary to that of Pr1 (St. Leger et al. 1996).

Gupta et al. (1994) have shown a correlation between the production of high levels of chitinases and proteases and the virulence of *B. bassiana* against *Galleria mellonella* L. and *Trichoplusia ni* Hubner. In addition, Fang et al. (2005) proved that an overexpression of a chitinase gene (Bbchit1) enhanced the virulence of *B. bassiana* to aphids (*Myzus persicae* Sulzer), compared with a wild-type strain.

Only a few papers have focused on the production of these enzymes by Brazilian strains of *B. bassiana*. However, Campos et al. (2005) have detected the presence of chitinases and proteases in the cuticle of *Boophilus microplus* Canestrini. In addition, Dias et al. (2008) and Donatti et al. (2008) evaluated the production of Pr1 and Pr2 after growing the fungus in the presence of coffee-borer cuticle *Hypothenemus hampei* Ferrari and of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn.

In this study, we focus on the production of these enzymes in medium containing *D. saccharalis* cuticle, the objectives being to: (1) evaluate different methods of infecting *D. saccharalis* with *B. bassiana*; (2) investigate the production of proteases and chitinase by *B. bassiana* in the presence of the cuticle of sugarcane borer; and, (3) evaluate the relationship between the production of enzymes and pathogenicity of the strains, contributing to the understanding of the parasite-host relationship.

2. Material and methods

2.1 *Diatraea saccharalis* larvae

The third stage borers were obtained from the Sugarcane Experimental Station of Carpina/Federal Rural University of Pernambuco/Brazil and were maintained with artificial diet, which basically consists in a solution of vitamins, sugar, soy meal, wheat germ, ascorbic acid and water, according to the protocol of Hansley and Hammond (1968).

However, 24 hours before the bioassays, each larva was confined individually in plastic containers (17 cm x 21 cm x 25 cm) with sugarcane stalks as the food source.

2.2 Reactivated inoculum suspension

The *B. bassiana* strains isolated originally from different hosts were supplied by Micoteca URM (University Recife Micology/UFPE) (Table 1). To reactivate the strains, they were inoculated in Petri dishes containing potatoes dextrose agar plus Chloramphenicol (0.05% v/v), supplemented with 0.5% of yeast extract (PDAY) and incubated at 26°C for 12 days for conidiation. Following incubation, conidia harvest was prepared in 0.01% v/v Tween 80 in sterilized distilled water and were sprayed through the use of micro-atomizer brand Paasche "VL" on ten *D. saccharalis* larvae placed on Petri dishes and incubated at 26°C until insect death. Newly emerged conidia from the insect were subcultured not more than four times, at ten days intervals in PDAY and used to prepare the reactivated inoculum suspension containing 10^8 conidia/mL (Ito et al. 2007). To confirm viability, the conidia were spread on PDAY and incubated for 16 h at 26°C. Germination rates were scored at

400 × magnification by observing under microscope, at random, 100 conidia for the presence of germ tubes. Germination was at least 90% throughout the study.

2.3 Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*

Ten *B. bassiana* strains were screened for their pathogenicity to third instar larvae of *D. saccharalis*. To infection *Diatraea saccharalis* larvae were placed in a sterile Petri dish (9 cm in diameter) and then sprayed with 1 ml of the reactivated inoculum suspension, as per item 2.2.

2.4 Effects of the methods of infection by *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*: spraying, dipping and stalks exposed to fungus

Beauveria bassiana URM2915, *Beauveria bassiana* URM2930 and *Beauveria bassiana* URM4548 were selected for the following experiments considering significant differences on mortality.

A batch of ten third stadium larvae of *D. saccharalis* were sprayed with 1 mL of the reactivated inoculum suspension, using an atomizer as described above.

In evaluating the dip method, larvae were immersed in 3 ml of the reactivated inoculum (10^8 conidia/mL) for 30 seconds in a Petri dish (9.0 cm). Later, for both methods of infection, the larvae were dried on filter paper and were later individualized in containers (17 cm x 21 cm x 25 cm) with sugarcane stalks as nutrition substrate.

To evaluate the third infection method, sugarcane stalks (20 mm in diameter) were placed in Petri dish (9.0 cm) and sprayed with 3 ml of the same fungal

suspension. The Petri dish containing the sprayed stalk material was then left on a laboratory bench to allow to dry for 20–30 min. Ten larvae were then transferred to containers with conidia treated stalks and allowed to feed for 24h. After this, the larvae were carefully removed and placed in clean containers and were then provided with unsprayed stalks.

The control group was sprayed, dipped, or provided with stalks treated with sterile water containing 100µl of Tween 80 (Tefera and Pringle 2003a). For each treatment, five containers were used, each containing 10 larvae.

The observations were taken daily for a period of seven days and larvae died were removed daily. To confirm the mortality by the fungus, the dead larvae were immediately surface sterilized with 1% sodium hypochlorite followed by three rinses with sterile distilled water, placed on sterile wet filter paper in sterile Petri dishes. Mortality due the fungus was confirmed by microscopic examination of hyphae and spores on the surface of the cadaver.

2.5 Statistical analysis

Percent mortality was corrected for control mortality (Abbott 1925) and normalized by arcsine transformation before being subjected to analysis of variance (ANOVA) using the ASSISTAT 7.5. The Tukey test analysis was used to separate the means as a post-ANOVA procedure ($p < 0.05$). Pearson's Correlation Coefficient was used in checking the level of correlation between virulence and enzyme activity. All statistical analysis was carried out using the ASSISTAT 7.5 beta software (Silva and Azevedo, 2002).

2.6 Enzyme assays

A suspension containing 1×10^6 conidia/mL was inoculated in 30 mL of the minimal liquid medium (MM) (Pontecorvo et al., 1953) and in MM + cuticle (MM + CUT): MM lacking a source of nitrogen and of glucose but with the addition of cuticle from larvae of *D. saccharalis* (0.5%) w/v, which had been prepared using a solution 0.2M potassium tetra-borate. The cuticle extract was added to previously sterilised (121°C for 15 min) MM and autoclaved for 5 min at 115°C (Dias et al. 2008).

Cultures were incubated at 28°C and maintained under agitation (180 rpm) out to 24, 48, 72 and 96h. After incubation, each culture flask was centrifugated at 8000g for 15 minutes at 4°C to separate the mycelium and the supernatant obtained was stored at -20°C for enzyme assays. The design was completely randomized, in a factorial scheme 3 x 2 x 4 (3 strains + 2 culture media + 4 incubation times), for a total of 24 treatments, with three repetitions.

The subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activities were assayed using N-Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-p-nitroanilide and N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide (Sigma, St. Louis, MO) as substrates, respectively. Each assay consisted of 0.05 mL 1mM substrate, 0.1 mL enzyme sample, and 0.85 mL 15 mM Tris-HCl, pH 8.0. The mixture was incubated for 30 min at 28° C and the reaction was stopped by adding 0.25 mL of 30% acetic acid and left to stand for 15 min in ice, after which samples were centrifuged at 1250g for 5 min at 4°C. The supernatants were compared at 410nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of the enzyme able to release 1 µmol of nitroanilide (NA) per milliliter per second at 28°C (Donatti et al. 2008).

Chitinase activity was assayed by the method of Nahar et al. (2004). The reaction mixture containing 1 mL of 1% colloidal chitin and 0.5 mL of supernatant solution was incubated for 1 h at 50°C and the reaction was stopped by immersion in a bath of boiling water for 1 min. After centrifugation, 250 µL from the supernatant fluid was incubated with 50 µL of 0.8M sodium tetra-borate, pH 8.0 at 100°C for 3 min. After the mixture was cooled, 1.5 mL of p-dimethyl aminobenzaldehyde (DMAB) solution (1g of DMAB dissolved in 100 mL of glacial acetic acid containing 1% v/v hydrochloric acid) was added and the mixture was incubated for 20 min at 37°C. Absorbance at 585 nm was measured against water as a blank. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme which produced sugars equivalent to 1 µmol of *N*-acetylglucosamine per min under the conditions described above.

3. Results

3.1 Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*

Mean mortality in the control was 5.4% seven days after the treatment. All the fungal isolates were pathogenic to larvae of *D. saccharalis*, causing mortality of between 26 e 88% (Table 1). There were, however, significant differences in mortality between fungal isolates ($F=75.26$; df : 10; $p<0.01$). The strains URM2915, URM2921 and URM3447 caused the highest mortality while the URM2924 caused the lowest ($26 \pm 3.5\%$).

3.2 Effect of methods of infection of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*

All fungal isolates selected for this study were all also pathogenic to the host at all methods tested, but there were significant interaction between the strains and the methods of application ($F=22.03$; $df=6$; $p<0.01$) (Figure 1). For example, at dip method there was no significant difference between *Beauveria bassiana* URM2915 and *Beauveria bassiana* URM2930. However, at spray and stalks methods, significant differences were observed between all isolates.

The dip method was the most efficient in controlling the larvae for all isolates and the stalk method was the less efficient ($F=205.41$; $df=2$; $p<0.01$). The mortality varied significantly between strains ($F=680.63$; $df=3$; $p<0.01$), being of 70 to 90% when *D. saccharalis* larvae were dipped, from 65 to 91% when sprayed and 26 to 42% when fed with fungus infected stalks. *Beauveria bassiana* URM2915 was the best in the three methods and the *Beauveria bassiana* URM4548 was least efficient.

3.3 Production of subtilisin-like and trypsin-like enzymes and chitinase in the presence of the cuticle of sugarcane borer

The production of these enzymes was determined after the growth of the strains in liquid medium in the presence and absence of cuticle (0.5%) of *D. saccharalis*. All strains of *B. bassiana* produced Pr1 and Pr2 in MM+CUT and there were significant differences between the strains (Table 2). For each of the three strains, Pr1 activity was detected at 24h of growth. For *Beauveria bassiana*

URM2930 and *Beauveria bassiana* URM4548 the peak of activity was observed at 72h of growth. In the MM, Pr1 activity was detected at 48h for URM4548, at 72h for URM2915 and at 96h of incubation only for the *Beauveria bassiana* URM29930 (Table 3). Similarly, Pr2 activity was detected at 24h of incubation in the MM + CUT, and the peak of the activity was observed at 96h. It was not possible to detect activity in the medium containing nitrate as the sole nitrogen source (MM) (Table 4).

As shown in Tables 3 and 4, the strains studied produced higher levels of Pr1 than Pr2, highlighting *Beauveria bassiana* URM2930 in production of Pr1 (73.74 U/ml) and URM2915 in production of Pr2 (35.12 U/ml).

Chitinase activity was detected at 24h of incubation on MM+CUT and at 72h on MM for URM2915 and URM4548. The amount of secreted enzymes varied between the stains and the highest activity was observed for *Beauveria bassiana* URM2915 strain (28.93U/ml) at 96h. Enzyme activity was investigated for a period of 96h and the highest chitinase activity was observed on the last time in the two culture media (Table 5). However, the chitinase activity was higher in MM + CUT at all incubation times compared to activities on MM (Table 2).

There was significant interaction among the strains and culture media in the production of the enzymes and there were also interaction between culture media and incubation time in the production of proteases and chitinase (Table 2). These interactions were caused by the fact that enzyme activity was highest in medium containing cuticle and increased with the time of incubation.

Correlation analysis between the percentage of mortality and Pr1($r = 0.591$; $p < 0.01$), Pr2 ($r = 0.987$; $p < 0.01$) and chitinase ($r = 0.693$; $p < 0.01$) activity of strains suggests a positive correlation of these variables in the medium containing cuticle.

4. Discussion

Although all the ten fungal isolates tested were pathogenic to *D. saccharalis*, there were significant variations amongst the isolates. These variations have been reported in many arthropod pests (Bugeme et al. 2009; Godonou et al. 2009; Abood et al. 2010; Sevim et al. 2010). This emphasizes the need of screening for strain selection.

The three fungal strains selected for different methods bioassays caused high mortality of up to 60% in sugarcane borer larvae when using the methods of dip or spraying. In comparison, the insects fed with infected stalks had up to 42% mortality. In studies with larvae of Colorado Potato Beetle, Fernandez et al. (2001) also noted that the larvae sprayed directly with *B. bassiana* conidia were more susceptible than the larvae that fed with infected leaves. In general, the mortality caused by entomopathogenic fungus when fed together with substrate (leaf or stalk) is lower as compared to other methods of fungus inoculation (Tefera and Pringle 2003a). However, the capacity to cause mortality by ingestion is relevant when it comes to selecting strains. As reported by Tefera and Pringle (2003b) the insects that are not directly impacted by the conidia on the field can still become contaminated if they come in contact with the plant or feed from it.

The inoculation results by spraying in this work, were similar to those of Wright et al. (2010). These authors evaluated virulence of *B. bassiana* against different species of lepidoptera and observed that mortality was high and varied positively among the 43 isolates used, thus showing the potential of the fungus against different pests. Kaur and Padmaja (2008) evaluated the action of 23 *B. bassiana* isolates, obtained from different hosts and different regions, against

Spodoptera litura Fabricius and verified that pathogenicity varied among them, but there was no correlation between the variability and the host's geographic origin, as observed in this work. In spite of there not being significant differences in the mortality caused by the methods of dipping or spraying, the onset of mortality was different according to the exposure to the fungus. Mortalities were registered one day after inoculation when the larvae were dipped and after two days when they were sprayed. Mortality occurred earlier in the larvae dipped probably because both sides, dorsal and ventral, were exposed and acquired more conidia than the larvae sprayed, as suggested by Tefera and Pringle (2003a).

The insect cuticle forms an effective barrier against organisms lacking an active cuticle penetration mechanism (virus, bacteria and protozoa). Only entomopathogenic fungus can penetrate their hosts through the cuticle, using physical and/or enzymatic mechanisms (St. Leger et al. 1995). In this paper, we studied the production of the main enzymes involved in the process of infection, in three strains of *B. bassiana* in the presence and absence of *D. saccharalis* cuticle.

So, as reported by Dias et al. (2008), we observed that when cuticle was added to the medium, there was an increase in production of Pr1 and Pr2, indicating that this was stimulated by cuticle components. By contrast, Tiago et al. (2002) demonstrated that *M. flavoviride* (= *M. anisopliae* var. *acridum*) has high levels of Pr2 only in MM, with other negative effects being found in the presence of cuticle of *Schistocerca pallens* Thunberg.

In this study, production of Pr1 was higher as compared to Pr2 with peaks of activity also being different, suggesting that there are different regulatory systems for these enzymes. Similar results were obtained by Donatti et al. (2008), emphasizing that the differences in production of enzymes may reflect different functions in the infection

process. In addition, both proteases were produced at 24h of incubation in medium containing cuticle, suggesting their expression is not coordinated in this fungus. Similar data was observed in *B. bassiana* grown in *H. hampei* cuticle (Dias et al. 2008). Differently, Paterson et al. (1994) reported that Pr2 occurs before and would be involved in the activation or induction of Pr1 in *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Differences between fungus species reveal that a complex mechanism is involved in the production of cuticle-degrading proteases.

Chitinase production by *B. bassiana* URM2915, URM2930 and URM4548 strains was higher during the last days of incubation in the medium containing cuticle as the sole source of carbon and no significant activity was observed in the medium without cuticle. The enhancing effect of cuticle on chitinase production suggests that this enzyme may be specifically induced by a cuticular component. Studies have evaluated the effects of different sources of carbon in the production of this enzyme and observed that when the fungus was grown in medium with cuticle and glucose, production was lower than in medium containing only cuticle (Campos 2005), and that there was repression of the enzyme when a easily available carbon source, glucose, was added to the medium (Dhar and Kaur 2010). Chitinase production was as high as for Pr1 production, which can be explained by the composition of the insect's cuticle, a composite material consisting of arrangements of highly crystalline chitin nanofibres embedded in a matrix of protein (Vincent and Wegst 2004). As reported by Fang et al. (2009), *B. bassiana* transformants secreting the fusion protein (protease and chitinase gene) penetrated the cuticle significantly faster than the wild type or transformants overexpressing either chitinase or protease gene.

As reported in the literature, the production of cuticle-degrading enzymes is one of the pre-requisites for fungal infection (Mustafa and Khaur 2010), and demonstrates

the relation between production and virulence that has been targeted by several investigations. The current study has provided evidence for the relationship between enzyme production and virulence of *B. bassiana* against *D. saccharalis*. According with our results, Gupta et al. (1994) showed that levels of production of Pr1, Pr2 and NAGase (chitinase) have been related to virulence parameters in *B. bassiana*. Moreover, Kim et al. (2010) showed that from the bioassay with the enzyme-inhibited supernatants processed by substrate inhibition one by one, decreased aphicidal activities were observed for all three enzyme-inhibited treatments. This finding provides evidence that the enzymes (Pr1, Pr2 and most particularly the chitinase) in the supernatant of *B. bassiana* were strongly involved in the aphicidal activity. Pelizza et al. (2011) screened 28 isolates of *B. bassiana* and nine isolates of *M. anisopliae* for chitinase production in solid medium and the results suggest a direct relationship between a high chitinolytic activity and an efficient virulence of the fungal strain against the tested insect pest (*Tropidacris collaris* Stoll). On the other hand, Silva et al. (2005) tested the larvicidal effect of *M. anisopliae* isolates against *Aedes aegypti* and the isolates showed a high variability of total protein production and NAGase activity after 48 and 72 h incubation in MM, but no relationship between enzyme levels and insecticidal activity could be detected, suggesting that other factors may be involved in the process.

The results presented in this study reveal that laboratory bioassays are still a relevant stage in selecting the most efficient strains for controlling pests. The pathogenicity of *B. bassiana* can be influenced by exposure methods, direct applications of fungus result in higher mortality than exposure to fungus-inoculated stalks. These studies confirm that the production of cuticle-degrading enzymes by *B. bassiana* is influenced by specific components of the cuticle of *D. saccharalis*. This paper showed that there was a relationship between enzyme production and pathogenicity of *B.*

bassiana, but many factors interfere directly in this process, more research is needed about this complex mechanism.

Acknowledgments

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and to Dr. David Bousfield for reviewing the manuscript.

5. References

- Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.
- Abood F, Bajwa GA, Ibrahim YB, Sajap AS, 2010. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against the Tiger Moth, *Atteva sciodoxa* (Lepidoptera: Yponomeutidae). J. Entomol. 7, 19-32.
- Alves SB, Rossi LS, Lopes RB, Tamai MA, Pereira RM, 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Invertebr. Pathol. 81, 70–77.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG, 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1679–1684.

Bugeme DM, Knapp M, Boga HI, Wanjoya AK, Maniana NK, 2009. Influence of Temperature on Virulence of Fungal Isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*. Mycopathologia. 167, 221-227.

Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Silva MV, Barros NM, Azevedo JL, Schrank A, Vainstein, MH, 2005. *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. Curr. Microbiol. 50, 257–261.

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC, 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Braz. J. Microbiol. 39, 301-306.

Dhar P, Kaur G, 2010. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Beauveria bassiana* isolates. Afri. J. Biotechnol. 9, 8092-8099.

Donatti AC, Furlaneto-Maia L, Fungaro MHP, Furlaneto MC, 2008. Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. Curr. Microbiol. 56, 256-260.

Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y, 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. Appl. Environ. Microbiol. 71, 363–370.

Fang W, Feng J, Fan Y, Zhang Y, Bidochka MJ, St. Leger RJ, Pei Y, 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 102, 155-159.

Fernandez S, Groden E, Vandenberg JD, Furlong MJ, 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Invertebr. Pathol. 77, 217–226.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC de, Berti Filho, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C, 2002. Manual de Entomologia Agrícola. 3th edition. Piracicaba, FEALQ.

Godonou BJ, Atcha-Ahowe' C, Vodouhe' S, Kooyman C, Ahanche' de'A, Korie S, 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). Crop. Prot. 28, 220–224.

Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM, 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria basiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 64, 13-17.

Hajek AE, Delalibera Jr I, 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. BioControl. 55, 147–158.

Hensley SD, Hammond AH, 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61, 1742-1743.

Ito ET, Varéa-Pereira G, Miyagui DT, Pinotti MHP, Neves PMOJ, 2007. Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. Braz. Arch. Biol. Technol. 50, 217-223.

Kaur G, Padmaja V, 2008. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. Afr. J. Microbiol. Res. 2, 299-307.

Kim JS, Roh JY, Choi JY, Wang Y, Shim HJ, Je YH, 2010. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. Fungal Biol. 114, 120–128.

Lacey LA, Frutos R, Kaya HR, Vail P, 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biol. Control. 21, 230–248.

Lewis LC, Bruck DJ, 2002. Gunnarson, R.D. On-farm evaluation of *Beauveria bassiana* for control of *Ostrinia nubilalis* in Iowa, USA. BioControl. 47, 167–176.

Mustafa U, Kaur G, 2010. Studies on Extracellular Enzyme Production in *Beauveria Bassiana* Isolates. Int. J. Biotech. Biochem. 6, 701–713.

Nahar P, Ghormade V, Deshpande MV, 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. J. Invertebr. Pathol. 85, 80-88.

Paterson IC, Charnley AK, Cooper RM, Clarkson M, 1994. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Microbiol. 140, 3153-3159.

Pelizza SA, Eliades LA, Saparrat MCN, Cabello MN, Scorsetti AC, Lange CE, 2011. Screening of Argentine native fungal strains for biocontrol between fungal pathogenicity and chitinolytic enzyme activity. World. J. Microbiol. Biotechnol. DOI: 10.1007/s11274-011-0935-8.

Pontecorvo G, Oper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AWJ, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5, 141-238.

Sevim A, Demir I, Demirbag E, 2010. Molecular characterization and virulence of *Beauveria* spp. from the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). Mycophatologia. 170, 269-277

- Silva ASF de, Azevedo CAV de, 2002. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Rev. Bras. Prod. Agro. 4, 71-78.
- Silva VCA, Barros R, Marques EJ, Torres JB, 2003. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Neotrop. Entomol. 32, 653-658.
- Silva RO, Silva HHG, Ulhoa CJ, Luz C, 2005. Is there a relationship between *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in Central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae)? J. Appl. Entomol. 129, 158–164.
- St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK, 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. J. Invertebr. Pathol. 47, 167-177.
- St. Leger RJ, Durrands PK, Cooper RM, Charnley AK, 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Arch. Microbiol. 150, 413-416.
- St. Leger RJ, 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Can. J. Bot. 73, 1119-1125.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW, 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1257-1264.
- Tefera T, Pringle KL, 2003a. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Invertebr. Pathol. 84, 90–95.

Tefera T, Pringle KL, 2003b. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. J. Invertebr. Pathol. 84, 220–225.

Tiago PV, Fungaro MHP, Furlaneto MC, 2002. Cuticle degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. Lett. Appl. Microbiol. 34, 91-94.

Vijayavani S, Reddy KRK, Murthy GBVN, 2009. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Euteromycotina: Hyphomycetes) strains on *Spodoptera litura* (Fab.) J Biopest 2, 205-207.

Vincent JFV, Wegst UGK, 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. Arth. Struc. Dev. 33, 187–199.

Wright SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD, 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. J. Invertebr. Pathol. 103, 186-199.

Table 1: *Beauveria bassiana* strains deployed in the experiments and their pathogenecity against *Diatraea saccharalis* larvae

Access number	Insect host of origin	Site of origin	Mortality ^a (%) ± SE
URM2912	<i>Cyclonella sanguinea</i> (Coleoptera)	Paraná/BR	42 ± 3.42 c
URM2915	<i>Nezara viridula</i> (Hemiptera)	Paraná/BR	88 ± 3.8 a
URM2916	Coleoptera	Brasília/BR	76 ± 4.2 ab
URM2920	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera)	Brasília/BR	68 ± 4.5 b
URM2921	<i>Lebia concinna</i> (Coleoptera)	Paraná/BR	84 ± 5 a
URM2923	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera)	Paraná/BR	76 ± 4.7 ab
URM2924	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera)	Brasília/BR	26 ± 3.5 d
URM2930	<i>Euschistus heros</i> (Hemiptera)	Paraná/BR	80 ± 5 ab
URM4548	<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera)	Buenos Aires/ARG	66 ± 5.1 b
URM3447	<i>Castnia licus</i> (Lepidoptera)	Pernambuco/BR	86 ± 4.5 a

^aMean followed by the same letter are not significantly different. Data were arcsine transformed before analysis.

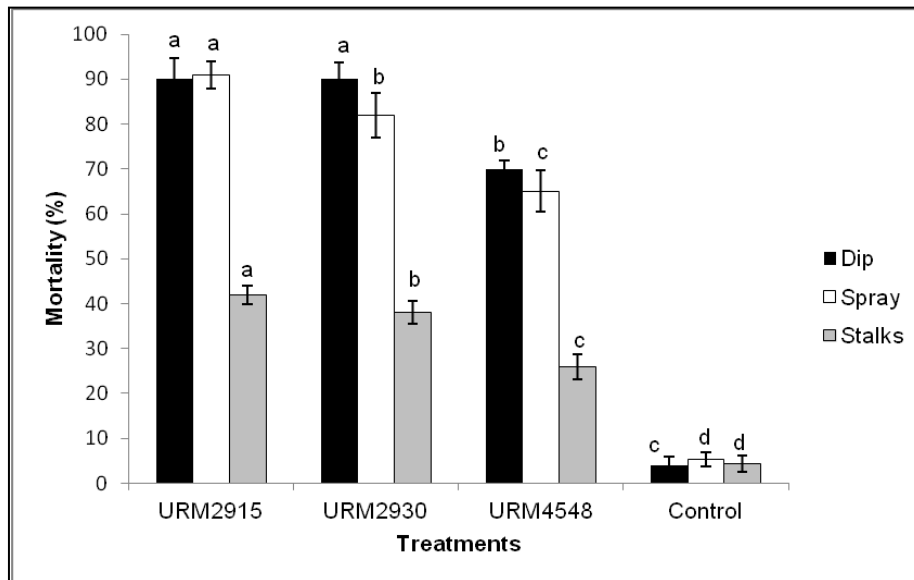


Fig. 1: Mortality (%) of third stadium larvae *Diatraea saccharalis* following different methods of exposure to *Beauveria bassiana* URM2915, URM2930 and URM4548. Bars with the same letter between strains do not differ statistically ($p < 0.01$). Data were arcsine transformed before analysis.

Table 2. Factorial analysis of the strains, culture media and incubation times in the production of proteases (Pr1 and Pr2) and chitinases by *Beauveria bassiana* in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle

Factor	Pr1			Pr2			Chitinase		
	df ^a	Mean square	F	df	Mean square	F	df	Mean square	F
Strains (S)	2	78.77	2.55*	2	0.357	0.45*	2	46.68	27.81*
Culture media (CM)	1	2020.5	654.82*	1	6441.5	8257.4*	1	2062.5	1228.7*
Time (T)	3	3881.5	125.82*	3	556.5	713.45*	3	318.55	189.77*
S × CM	2	238.8	7.74 *	2	0.35	0.45*	2	52.27	31.13*
S × T	6	13.97	0.45	6	4.75	6.09*	6	2.89	1.72
CM× T	3	2490.9	80.74*	3	556.55	713.4*	3	287.60	171.3*
S × CM × T	6	35.27	1.14	6	4.75	6.09	6	2.29	1.36

* Significant to the 99% level of probability ($p < 0.01$)

^adf: degree of freedom

Table 3. Subtilisin-like (Pr1) activity (U/ml) in supernatant cultures of *Beauveria bassiana* grown in minimal medium (MM) and minimal medium plus *Diatraea saccharalis* cuticle (MM+CUT)^a

Strains	24h		48h		72h		96h	
	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT
URM2915	0	1.53±0.04	0	46.83±0.08	0.83±0.02	68.83±0.19	2.92±0	70.79±0.19
URM2930	0	0.55±0.01	0	45.16±0.2	0	73.74±0.12	3.4±0.01	70.46±0.04
URM4548	0	1.04±0.02	15.26±0.24	40.70±0.57	15.89±0.17	68.70±0.40	17±0.26	66.70±0.25

^aThe Pr1 activities are means standard errors of the means based on three replicates

Table 4. Trypsin-like (Pr2) activity (U/ml) in supernatant cultures of *Beauveria bassiana* grown in minimal medium (MM) and minimal medium plus *Diatraea saccharalis* cuticle (MM+CUT)^a

Strains	24h		48h		72h		96h	
	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT
URM2915	0	1.95±0.01	0	26.83±0.06	0	30.04±0.01	0	35.12±0.04
URM2930	0	1.46±0.04	0	25.71±0.08	0	30.59±0.07	0	34.71±0.04
URM4548	0	6.41±0.01	0	25.16±0.14	0	29.34±0.04	0	30.66±0.00

^aThe Pr2 activities are means standard errors of the means based on three replicates.

Table 5. Chitinolytic activity (U/ml) in supernatant cultures of *Beauveria bassiana* grown in minimal medium (MM) and minimal medium plus *Diatraea saccharalis* cuticle (MM+CUT)^a

Strains	24h		48h		72h		96h	
	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT	MM	MM+CUT
URM2915	0	3.70±0.2	0	14.21±0.4	0.17±0	22.2±0.7	0.59±0.0	28.93±0.1
URM2930	0	0.17±0.0	0	10.01±0.4	0	16.73±0.1	0	22.2±0.2
URM4548	0	0.17±0.0	0	4.54±0.1	1.01±0.02	15.05±0.1	1.01±0.01	22.2±0.2

^a The chitinase activities are means standard errors of the means based on three replicates.

CAPÍTULO II

Horizontal transmission and the effect of temperature in pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Virgínia Michelle Svedese^{*(1)}, Elza Áurea de Luna-Alves Lima⁽¹⁾ and Ana Lúcia
Figueiredo Porto⁽²⁾

Artigo submetido ao Brazilian Archives of Biology and Technology

* Author for correspondence: vsvedese@hotmail.com

Telephone number: 55 81 2126 8479

Fax number: 55 81 2126 8480.

ABSTRACT- Brazil is the largest sugarcane producer in the world, followed by India and China. The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* is considered one of the most harmful pests for sugarcane. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* appears as an excellent form of control alternative to this pest. The aim of this paper was to evaluate the effect of different temperatures on the pathogenicity of two strains of *B. bassiana* against *D. saccharalis* and evaluate the horizontal transmission capacity among sugarcane borer larvae. The strains were most pathogenic at 26 and 32°C than at 20°C, with respective mortalities of 100, 50 and 30.3%. The lethal time was also affected by the temperature, with the shortest TL₅₀ observed at 26°C (2.2 days) and the longest at 20°C (16.2 days). *Beauveria bassiana* was effectively transmitted between individuals, leading to significant mortality. *Beauveria bassiana* URM2915 stood out in all experiments as having potential for deployment in biological control programs for the sugarcane borer. Success in horizontal transmission of *B. bassiana* is indicative that this procedure can also be adopted as control strategy for the sugarcane borer.

Keywords: sugarcane borer; Lepidoptera; entomopathogenic fungus; biological control; autodissemination.

1.Introduction

Brazil is the largest sugarcane producer in the world, followed by India and China. With over seven million hectares planted and a production of over 480 million tons. The country is world leader in technology for production of ethanol. This advantage stems from the suitability of sugarcane for planting in regions of tropical climate, hot and moist, with prevailing temperature between 19 and 32° C and well distributed rainfall patterns, with aggregate rates of over 1000 millimeters a year. However, below 20°C or above 35°C, growth rates become very slow and above 38°C, it is virtually null. (EMBRAPA 2011).

The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae), is considered one of the most harmful pest for sugarcane farming, not just in Brazil, but also in the majority of the countries where this crop is farmed. The borer acts in the internodes of the sugarcane stalk, digging galleries, which later allow other diseases to become established, resulting in reduced sugar production and in fermentation power which is responsible for the production of alcohol (Gallo 2002). Given the cryptic habit, conventional control measures using chemical pesticides targeted at the larvae are practically useless (Cruz 2007). Therefore, the use of natural agents, like entomopathogenic fungi, appears as an excellent form of control alternative (Azevedo 1998). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin is of generalized occurrence in all these countries, being the most frequently found on insect and soil samples, where they are able to subsist for long periods of time (Lacey et al. 2001).

As reported by Alves and Lecuona (1998), the simple presence of a structure of the pathogen on an insect, or in it, is not condition sufficient for the onset of a disease,

several factors (biotic and abiotic) are involved in promoting the occurrence of infection. Among the several environmental factors that affect insect pathogens, temperature, moisture and solar radiation are probably the most severe (Inglis et al. 1996). Nonetheless, any strategy for deployment of *B. bassiana* in the field as a myco-insecticide needs to take into account the prevalent weather conditions in the target areas (Luz and Fargues 1997). For this purpose, some studies have simulated different environmental situations and assessed the virulence of entomopathogenic fungi (Tefera and Pringle 2003; Dimbi et al. 2004; Bouamama et al. 2010).

Another important aspect in biological control is the transmission capacity between the different hosts, since viability of horizontal transmission represents a new opportunity for Integrated Pest Management programs (Toledo et al. 2007) and offers a few advantages such as reduction in both, the volume of inoculum and of the area treated with the fungus, minimizing adverse effects in non-target organisms (Quesada-Moraga et al. 2008). The horizontal transmission between different hosts of *B. bassiana* (García-Munguia et al. 2011), *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Peng et al. 2011) and *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize) Brawn & Smith (Avery et al. 2011) has already been shown, however this is first attempt at assessing the transmission of *B. bassiana* between larvae of *D. saccharalis*.

Based on the ideal development temperatures for sugarcane plantation, this paper intends to determine in laboratory, the effect of different temperatures in the efficiency of *B. bassiana* in control of the sugarcane borer, as well as evaluate the horizontal transmission between individuals of *D. saccharalis*, with a view to providing inputs for definition of new biological control strategies for this pest.

2. Material and Methods

2.1 *Diatraea saccharalis* larvae

The third stage borers were obtained from the Sugarcane Experimental Station of Carpina/ Pernambuco/Brazil and maintained under a Hansley and Hammond (1968) modified artificial diet, consisting basically in a solution of vitamins, Wesson salts, sugar, soy meal, wheat germ, ascorbic acid and water. However, 24 hours before the bioassays, each larva was confined individually in transparent containers (17 cm x 21 cm x 25 cm) with sugarcane stalks (as a food source).

2.2 Fungal strains

Beauveria bassiana URM2915 (isolated from *Nezara viridula* Hemiptera: Pentatomidae) and *Beauveria bassiana* URM3447 (isolated from *Castnia licus* Lepidoptera: Castniidae) were supplied by Micoteca URM (University Recife Micology /UFPE). The strains were inoculated in Petri dishes containing potatoes dextrose agar + Chloramphenicol (0.05%), supplemented with 0.5% of yeast extract (PDAY) and incubated at 26°C for 12 days for conidiation. Following incubation, conidia harvest was prepared in 0.01% v/v Tween 80 in distilled water, were sprayed through the use of a 35-ml glass atomizer, on ten *D. saccharalis* larvae placed on Petri dishes and incubated at 26°C until insect death. Newly emerged conidia from the insect were subcultured not more than four times, at ten days intervals in PDAY and used to prepare the reactivated inoculum suspension containing 10^8 conidia/mL (Ito et al. 2007). To confirm viability, the conidia were spread on PDAY and incubated

for 16 h at 26°C. Germination rates were scored at 400 × magnification by observing under microscope, at random, 100 conidia for the presence of germ tubes. Germination was at least 90% throughout the study.

2.3 Effect of temperature on pathogenicity of the *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*

Ten larvae were sprayed with the reactivated inoculum suspension. Later, they were individualized in containers with sugarcane stalks as nutrition substrate and maintained at 20, 26 e 32°C. Five replicates were conducted at each temperature. As a control, ten larvae were sprayed with sterile water containing 100µl of Tween 80.

Mortality was recorded daily for 7 days. Dead insects were placed on moistened filter paper-lined Petri dishes and incubated at their temperatures and 80% relative humidity. Larvae died were removed daily, immediately surface sterilized with 1% sodium hypochlorite followed by three rinses with sterile distilled water, placed on sterile wet filter paper in sterile petri dishes. Mortality due the fungus was confirmed by microscopic examination of hyphae and spores on the surface of the cadaver (Dimbi et al. 2004).

2.4 Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* between *Diatraea saccharalis* larvae

After being inoculated following the same experimental protocol described above, five larvae cadavers were then carefully transferred to Petri dishes (150 × 15 mm) and clean larvae were introduced at 3 proportions: 1:1 (5 cadavers and 5 clean larvae), 1:2 (5 cadavers and 10 clean larvae) and 1:3 (5 cadavers and 15 clean larvae). The control consisted of 20 clean larvae. Each proportion was replicated 4 times, and

the whole experiment was repeated 90 days later with insects from a new generation and new conidial plates (Quesada-Moraga et al. 2008).

The bioassay was conducted at 26°C and the mortality was monitored for 7 days. Larvae died were removed daily, immediately surface sterilized with 1% sodium hypochlorite followed by three rinses with sterile distilled water, placed on sterile wet filter paper in sterile Petri dishes. Mortality due the fungus was confirmed by microscopic examination of hyphae and spores on the surface of the cadaver.

2.5 Statistical analysis

Statistical significance among treatments was determined using a one-way ANOVA and mean separation were compared using the Tukey's test ($p < 0.05$) with software for statistical analysis -SPSS 2003. Lethal time (LT_{50}) values for insect mortality were determined by a Probit analysis.

3. Results and Discussion

Beauveria bassiana was pathogenic for the sugarcane borer, however the different test temperatures had a significant effect on mortality ($df = 2$; $F = 1040.08$; $p < 0.01$) e differed among the strains ($df = 1$; $F = 54.0509$; $p < 0.01$). There was a significant level of interaction between temperatures and strains ($df = 4$; $F = 73.2821$) (Figure 1). Mortality in the control group was low, not exceeding 08% in any of the temperatures. As has been emphasized in several papers, any strategy for the deployment of this fungus on the field, as a myco-insecticide must necessarily take into account the prevalent climate conditions at the target areas (Luz and Fargues 1997; Ekesi et al. 1999; Bouamama et al. 2010). So, selection of strains tolerant to the ideal

crop development and production temperature for the plant of interest is necessary for pathogens to be used successfully in biological control programs.

Even though strains were shown to be pathogenic at all test temperatures, the effect of this factor on pathogenicity of *B. bassiana* against *D. saccharalis* was also shown to be high. The strains were shown to be more pathogenic at 26 and at 32°C than at 20°C (Figure 1). For example, at the end of the experiment at 20°C, *Beauveria bassiana* URM2915 caused a mortality of 30.3%, whereas the mortality caused at 26 and 32°C was of 100% and 50%, respectively. *Beauveria bassiana* URM2915 showed mortality superior to *Beauveria bassiana* URM3447 only at a temperature of 20°C.

Similar results were shown in other papers using this entomopathogen against other insects (Sun et al. 2003; Dimbi et al. 2004; Brooks et al. 2004). The highest mortality (100%) displayed by both strains was caused at 26°C, which is in agreement with the experiments of Alexandre et al. (2008), where mortality of the *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae caused by *M. anisopliae* and *B. bassiana* at 26°C, was of 93.3% and 95.5%, respectively. When these fungi were incubated at 32°C, larval mortality was of 68.9% for *M. anisopliae* and 28.9% for *B. bassiana*. Differences in mortality can be explained by the fungi's biological characteristics. According to Hallsworth and Magan (1999), excellent growth rates can be obtained for *B. bassiana* at 25°C, however this fungus features good growth in the 20 to 30°C range. When exposed to higher temperatures, such as for example, at 37°C, growth is nearly nil. However, better tolerance to higher or lower temperatures may be related to the climate origin region of the isolate, as shown by Imoulán et al. (2011) on analyzing the occurrence, thermotolerance and virulence of *B. bassiana* isolates to *Ceratitis capitata* Wiedemann. In recent studies, Ment et al. (2010) showed the influence of environmental conditions on the development of *M. anisopliae* on the tick

Rhipicephalus annulatus Say and reported for the first time the occurrence of chlamydospores as unit of infection at high temperatures, instead of conidia. Therefore, it is clear that fungi have different strategies to survive adverse conditions and these characteristics become fundamental in establishing the disease.

Through Probit analysis, the Lethal Time, occurring as a function of the different temperatures was obtained (Table 1) and it was also noted that the LT_{50} was also significantly affected by temperature ($F=176.36$; $p<0.01$). The lowest LT_{50} was seen at 26°C for both strains. Based on the overlap of the confidence intervals, there was a significant difference between the LT_{50} of both strains when the larvae were subjected to temperatures of 20 and 26°C. Even though there was not very much difference at 32°C, the LT_{50} for *Beauveria bassiana* URM2915 was slightly shorter, reaching 6.56 days, while the one for *Beauveria bassiana* URM3447 was of 6.81 days.

In a different way, Bugeme et al. (2009) assessed the effect of temperature on the pathogenicity of *B. bassiana* on spider mite *Tetranychus urticae* Koch and noted that the LT_{50} decreased as the temperature increased, being 9.8 days at 20°C, 4.9 at 25°C and 3.3 at 32°C. As reported by Lohmeyer and Miller (2006), differences between the LT_{50} is a tool often used in selecting strains, which is interesting given that, in addition to being virulent, the fungus quickly kills its hosts. This puts *Beauveria bassiana* URM2915 at an advantage over *Beauveria bassiana* URM3447, since the borers treated with this strain died more quickly than the ones treated with the other strain.

Different from other insect pathogens, entomopathogenic fungi can infect their hosts by contact, penetrating the insect's cuticle, through horizontal transmission (Quesada-Moraga et al. 2004). The results obtained in the experiments with the *Beauveria bassiana* URM2915 and *Beauveria bassiana* URM3447 strains have shown

that there was efficient transmission between individuals of *D. saccharalis*, with mortality rates varying between 59 and 96.5% (Table 2). These results show the first report of transmission of *B. bassiana* between cadavers and healthy larvae of *D. saccharalis*. So, cadavers of borers inside stalks can contribute in the future for the dissemination of the disease inside the plant. This feature is extremely important in controlling the sugarcane borer using fungi, since the better part of this insect's lifecycle takes place inside the stalks making it harder for direct applications to reach the pest. In laboratory conditions, Talaei-Hassanloui et al. (2009) have shown that *B. bassiana* transferred between adults of *Eurygaster integriceps* Puton, causing mortalities of 50 to 65%. In similar situations, Dembillio et al. (2010) also revealed that *B. bassiana* was transmitted between adult coleopterans of palm trees, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier and their effects were also seen in the following generation.

The efficiency of horizontal transmission depends on a number of parameters, including the number and distribution of individuals in the infected population, as shown by Avery et al. (2011). Experiments showed there was no difference in the mortality caused by *Beauveria bassiana* URM2915 when ratios were 1:1 and 1:2. However, when the ratio of healthy individuals with respect to the number of cadavers increased, the mortality dropped off. This fact was more clearly noted in the treatment with URM3447, in which mortality varied significantly according to the ratio and fell in 26% when the ration reached 1:3 (Table 2). In lab experiments, *B. bassiana* conidia were transferred between treated and untreated adult beetles of *Ips typographus* L. resulting in 96% mortality when the ratio was of 1:1 and 83% when it was 1:5 (Kreutz et al. 2004). Similarly, Quesada-Moraga et al. (2008) investigated if adults of *C. capita* infected with *M. anisopliae* transmitted the fungus to uninfected flies of the opposite

sex during copula. In addition, transmission was directly related to the ratio and sex involved.

The capacity of transmission of *B. bassiana* between borers is an important parameter in selecting a control strategy for this pest, given that the presence of cadavers with the fungus on the field can help in establishing secondary foci of the disease and, in this way, increase mortality of the sugarcane borer, in addition to being fundamental in maintaining the inoculum in the environment (Bustilho et al. 2002; Estrada et al. 2004).

These results showed that the temperature interferes in the pathogenicity of *Beauveria bassiana* URM2915 and *Beauveria bassiana* URM3447 against *D. saccharalis* and the fungus can be transmitted between individuals of the borer, causing significant mortality. Success in horizontal transmission of *B. bassiana* is indicative that this procedure can also be adopted as control strategy for the sugarcane borer.

Acknowledgments

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

4. References

- Alexandre TM, Neves PMOJ, Santoro PH, Alves LFA. Controle associado de *Alphitobius diaperinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e inseticidas químicos. Arq Inst Biol. 2008; 75: 481-489.
- Alves SB. Fungos entomopatogênicos, In Alves SB, editor. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ. 1998. p. 289- 381.
- Alves SB, Lecuona RE. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves SB, editor. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ. 1998. p. 97-170.
- Alves SB, MORAES SA. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves SB, editor. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ. 1998. p. 765-777.
- Avery P, Queeley G, Faull J, Simmonds M (2010) Effect of photoperiod and host distribution on the horizontal transmission of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in greenhouse whitefly assessed using a novel model bioassay. Biocont Sci Technol 20: 1097-1111.
- Azevedo JL (1998) Controle Microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In Melo IS, Azevedo, JL. (Eds.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa p. 69-96
- Bouamama N., Vidal C, Fargues J (2010) Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. J Invertebr Pathol 105: 139-44.
- Brooks AJ, Muro MA De, Burree E, Moore D, Taylor MA, Wall R (2004) Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis*: effects of temperature and formulation. Pest Manag Sci 60:1043-1049.

- Bugeme DM, Knapp M, Boga HI, Wanjoya AK, Maniania NK (2009) Influence of Temperature on Virulence of Fungal Isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathol* 167: 221-227.
- Bustillo AE, Cárdenas R, Posada FJ (2002) Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. *Neotrop Entomol* 31: 35-639.
- Cruz I. 2007. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. EMBRAPA-CNPMS, Circular técnica. 90: 12.
- Dembillio O, Quesada-Moraga E, Santiago-Álvarez C, Jaca JA (2010) Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *J invertebr Pathol* 104: 214-221.
- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Mueke JM (2004) Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49: 83–94.
- Ekesi S, Maniania, KN, Ampong-nyarko K (1999) Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocont Sci Technol* 9: 177-185.
- Embrapa Cana-de-açúcar. Brasília. Available from: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>
- Estrada ME, Romero M, Rivero MJ, Barroso F (2004) Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. *Rev Iberoam Micol* 21: 42-43.

- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RP, Baptista GC, Berti Filho E, et al. Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p. 2002.
- García-Munguía AM, Garza-Hernández JA, Rebollar-Tellez EA, Rodríguez-Pérez MA, Reyes-Villanueva F (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. Parasite Vector 4:24-29.
- Hallsworth JE, Magan N (1999) Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. J Invertebr Pathol 74: 261-266.
- Hensley SD, Hammond AH (1968.) Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J Econ Entomol 61: 1742-1743.
- Imoulan A, Alaoui A, Meziane AE (2011) Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata*. World J Microb Biot 27:2619-2628
- Inglis GD, Johnson DL, Goettel MS (1996) Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. Biol Control 7: 131–139.
- Ito ET, Varéa-Pereira G, Miyagui DT, Pinotti MHP, Neves PMOJ (2007) Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. Braz Arch Biol Technol 50: 217-223.
- Kreutz J, Zimmermann G, Vaupel O (2004) Horizontal Transmission of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* among the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the Laboratory and under Field Conditions. Biocont Sci Technol 14: 837-848.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HR, Vail P (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biol Control 21: 230–248.

- Lohmeyer KH, Miller JA (2006) Pathogenicity of Three Formulations of Entomopathogenic Fungi for Control of Adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol 99: 1943-1947.
- Luz C, Fargues J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of the an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. Mycopathology. 1997. 138: 117-125.
- Ment D, Gindin G, Glazer I, Perl S, Elad D, Samish M (2010) The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. Fungal Biol 114: 49-56.
- Peng F, Gardescu S, Hajek AE (2011) Transmission of *Metarhizium brunneum* conidia between male and female *Anoplophora glabripennis* adults. BioControl 56: 771-780.
- Quesada-Moraga E, Santos-Quirós R, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C (2004) Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (anamorphic fungi) on the german cockroach (Blattodea: Blattellidae). J Invertebr Pathol 87: 51-58.
- Quesada-Moraga E, Martin-Carballo I, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C (2008) Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biol Control 47: 115–124.
- Sun J, Fuxa JR, Henderson G (2003) Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. J Invertebr Pathol 84: 38-46.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Hedjaroude GhA (2009) Transmission possibility of the fungus *Beauveria bassiana* KCF102 by mating behavior between Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae) adults. J Entomol Soc Iran 28: 1-6.

- Tefera T, Pringle KL (2003) Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). J Invertebr Pathol 84: 90–95.
- Toledo J, Campos SE, Flores S, Liedo P, Barrera JF, Villasenor A, Montoya P (2007) Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in the Mexfly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), under laboratory and field-cage conditions. J Econ Entomol 100: 291-297.

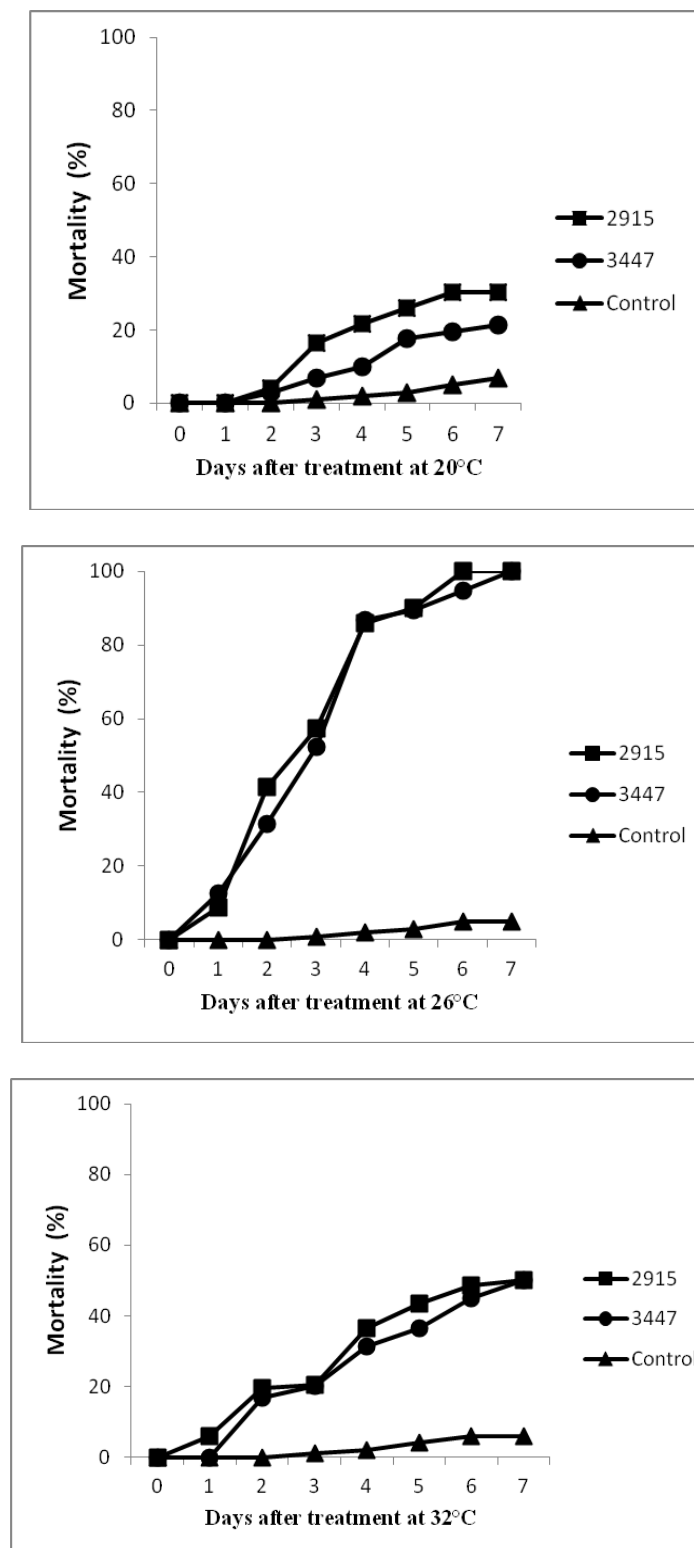


Figure 1: Mortality (%) of *Diatraea saccharalis* larvae inoculated with *Beauveria bassiana* (URM 2915 and URM3447) under different temperatures.

Table 1: Median Lethal Time (LT_{50}) of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* at different temperatures

Temperatures	Strains	LT_{50} (CI) ¹	Slope	χ^2
20°C	URM2915	11.08 (8.61-18.05)	2.05 ± 0.35	2.47
	URM3447	16.26 (11.13-38.81)	2.00 ± 0.41	1.54
26°C	URM2915	2.29 (2.11-2.47)	3.81 ± 0.24	5.07
	URM3447	2.51(2.32-2.70)	3.94 ± 0.25	9.80
32°C	URM2915	6.56 (5.64-8.07)	1.87 ± 0.22	3.45
	URM3447	6.81 (5.85-8.69)	1.98 ± 0.30	2.44

¹ Confidence interval (Significance at the 95%)

Table 2: Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* from inoculated *Diatraea saccharalis* larvae to clean larvae at different proportions

Proportion (cadavers/clean)	Mortality (%)	
	URM2915	URM3447
1:1 (5/5)	96,5± 2.1 Aa	85±2.4 Ab
1:2 (5/10)	95± 1.5 Aa	80±2.3 Bb
1:3 (5/15)	82± 3 Ba	59±4.4 Cb
Control group	4,2± 1.2 Ca	4,2±0.25 Da

Level of significance was determined using Tukey's methods of mean separation where $p < 0.05$. Mean followed by the same letter, small the row and capital letter the line, are not significantly different.

CAPÍTULO III

Influência da luz ultravioleta e da temperatura sobre o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* Vuillemin

Virgínia Michelle Svedese^{*(1)}, Elza Áurea de Luna-Alves Lima⁽¹⁾, Laura Mesquita
Paiva⁽¹⁾ and Ana Lúcia Figueiredo Porto⁽²⁾

O Artigo será submetido à Revista Arquivos do Instituto Biológico

* Author for correspondence: vsvedese@hotmail.com

Telephone number: 55 81 2126 8479

Fax number: 55 81 2126 8480.

Resumo

Os fungos entomopatógenos são sensíveis aos fatores bióticos e abióticos, que influenciam na sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre a germinação dos conídios, crescimento radial e esporulação de *Beauveria bassiana* (URM2915 e URM3447). A germinação variou em função do tempo de exposição à luz UV e da temperatura. O melhor crescimento foi obtido a 26°C, enquanto que a 32°C, o mesmo foi inibido. Por outro lado, a esporulação foi estimulada pela baixa temperatura e inibida pela radiação. O tempo de exposição à luz UV e a temperatura interferiram de diferentes modos nos parâmetros biológicos de *B. bassiana*.

1. Introdução

Nesta última década, o Brasil passou a ser o maior exportador mundial dos produtos derivados da cana-de-açúcar, com menores custos de produção. É cultivada em todos os estados, porém sua maior produção concentra-se no Estado de São Paulo, que detém aproximadamente 60% da produção nacional (Unica, 2010). No entanto, o cultivo da cana-de-açúcar sofre interferência de vários fatores que afetam diretamente a sua produção, dentre eles destacam-se os fitossanitários (Gallo et al., 2002). Como alternativa ao uso de inseticidas químicos, o emprego de fungos entomopatogênicos se mostra uma escolha promissora para o controle de várias pragas (Cruz, 2010).

Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin é de ocorrência generalizada em todos os países, sendo o fungo mais freqüente sobre insetos e amostras de solo, onde pode subsistir por longo tempo (Alves, 1998). Sua patogenicidade já foi comprovada contra diversas pragas, pertencentes a diversas ordens de insetos como, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (Kaur & Padmaja, 2008), *Ceratitis capitata* Weidemann (Diptera: Tephritidae) (Ortu et al., 2009), *Cornitermes cumulans* Kollar (Isoptera: Termitidae) (Toscano et al., 2010) e *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) (Vanmathi et al., 2011).

Porém, a simples presença de uma estrutura do patógeno sobre um inseto ou dentro dele não é condição suficiente para a ocorrência de uma doença (Alves & Lecuona 1998). Vários fatores (bióticos e abióticos) podem influenciar na sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro pelos entomopatógenos (Goethel et al. 2000). Entre os abióticos, a radiação ultravioleta (UV) é a mais importante, pois pode inativar os conídios, provocar danos letais ao DNA e causar mutações (Fargues et al., 1996). Ainda, a viabilidade e atividade dos fungos podem ser influenciadas pela

temperatura, umidade, substratos e modo de exposição ao patógeno (Tefera & Pringle, 2003; Nuñez-Gaona et al., 2010).

Diversos estudos demonstraram os efeitos adversos causados nos fungos entomopatogênicos pela radiação ultravioleta (Braga et al., 2002; Rangel et al., 2005; Fernandes et al., 2007) e pela temperatura (Dimbi, et al., 2004; Brooks et al., 2004). Assim, a seleção de linhagens tolerantes a estes fatores torna-se extremamente importante e indispensável, para aplicação de *B. bassiana* como micoinseticida no campo (Luz & Fargues, 1997).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da luz ultravioleta e da temperatura sobre a germinação, esporulação e crescimento radial de *B. bassiana*.

2. Material e Métodos

2.1 Linhagens fúngicas

Beauveria bassiana URM2915 (isolada de *Nezara viridula* Hemiptera: Pentatomidae) e *Beauveria bassiana* URM3447 (isolada de *Castnia licus* Lepidoptera: Castniidae) foram obtidas da Micoteca URM (University Recife Micology/UFPE). O fungo foi inoculado em placas de Petri contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) + Cloranfenicol (0,05%), suplementado com 0,5% de extrato de levedura e posteriormente foram incubados por 12 dias a 26°C.

2.2 Obtenção das colônias irradiadas

Da suspensão contendo 10^6 conídios/mL, 0,1 mL de cada linhagem foi semeada em placas de Petri contendo BDA e em seguida as placas foram submetidas à lâmpada germicida (radiação UV de 253,7 nm), distantes 25,0 cm da fonte de radiação, durante

15, 30 e 50 segundos (Ottati-de-Lima et al., 2010). Os conídios irradiados foram avaliados quanto à germinação dos conídios, esporulação e crescimento radial.

2.3 Germinação de conídios

Após exposição à luz UV, as placas de Petri semeadas com as linhagens fúngicas foram incubadas por 24 horas em B.O.D. a 26°C e o percentual de germinação foi determinado sob microscópio óptico com objetiva de 400×, contando-se 500 conídios (entre os conídios germinados e os não germinados). Considerou-se como conídio germinado aquele cujo tubo germinativo se apresentou maior que um terço do tamanho do conídio (Alves & Pereira, 1998). Um tratamento controle sem exposição à radiação também foi feito.

2.4 Esporulação

A produção de conídios foi avaliada coletando-se em cada colônia irradiada uma amostra central, uma intermediária e uma periférica, com o auxílio de um anel metálico esterilizado de 5mm de diâmetro, no 10º dia de incubação. Para cada tratamento amostras de três colônias foram coletadas. Estas amostras foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada e Tween 80 0,05%. Após remoção dos conídios por vigorosa agitação em Vortex, foi feita a contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Marques et al., 2004).

2.5 Crescimento radial

Com o auxílio de um anel metálico esterilizado de 5mm de diâmetro foram obtidos discos da colônia irradiada após 10 dias de crescimento. Os discos foram inoculados no centro da placa de Petri contendo BDA e o com o auxílio de régua milimetrada, o diâmetro da colônia foi mensurado 12 dias após a inoculação.

Para avaliar os efeitos da temperatura sobre a germinação dos conídios, esporulação e crescimento radial, os experimentos foram realizados como citados anteriormente, contudo as placas foram incubadas em diferentes temperaturas (20, 26 e 32°C) e não foram irradiadas.

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em caso de diferença significativa, foi feito o teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software ASSISTAT 7.5 (Silva & Azevedo, 2002).

3. Resultados e Discussão

3.1 Germinação dos conídios

As linhagens tiveram a germinação afetada em todos os tempos de exposição, diferindo estatisticamente entre si e entre o grupo controle (Figura 1). A germinação diminuiu com o aumento do tempo de exposição, por exemplo, 15 segundos de exposição foi suficiente para diminuir em 50% o número de conídios germinados de *Beauveria bassiana* URM2915 (Figura 2), já para *Beauveria bassiana* URM3447 o

efeito foi um pouco maior, o mesmo tempo de exposição diminui a germinação em 60%. Após 50 segundos, a germinação das duas linhagens foi quase nula. Diferentemente, Ottati-de-Lima et al. (2010) mostraram que a germinação média de *B. bassiana* após esse mesmo tempo de exposição foi de 30%, não diferindo estatisticamente dos experimentos após 25 segundos.

Existiu diferença estatística entre a germinação das duas linhagens nos tempos de 15 e 30 segundos ($F=136,66$; $df=1$; $p<0,05$). *Beauveria bassiana* URM2915 revelou germinação superior a *Beauveria bassiana* URM3447 nesses dois tempos, contudo quando a exposição foi elevada para 50 segundos, o efeito foi o mesmo. O efeito da luz UV sobre fungos entomopatógenos também foi estudado por Fernandes et al. (2007) quando demonstraram que a germinação dos conídios variou amplamente de acordo com o tempo de exposição e com a linhagem empregada, contudo a maioria das 53 linhagens de *B. bassiana* revelou germinação abaixo de 60%, o mesmo aconteceu com as linhagens *Beauveria bassiana* URM2915 e *Beauveria bassiana* URM3447, como mostra a Figura 1.

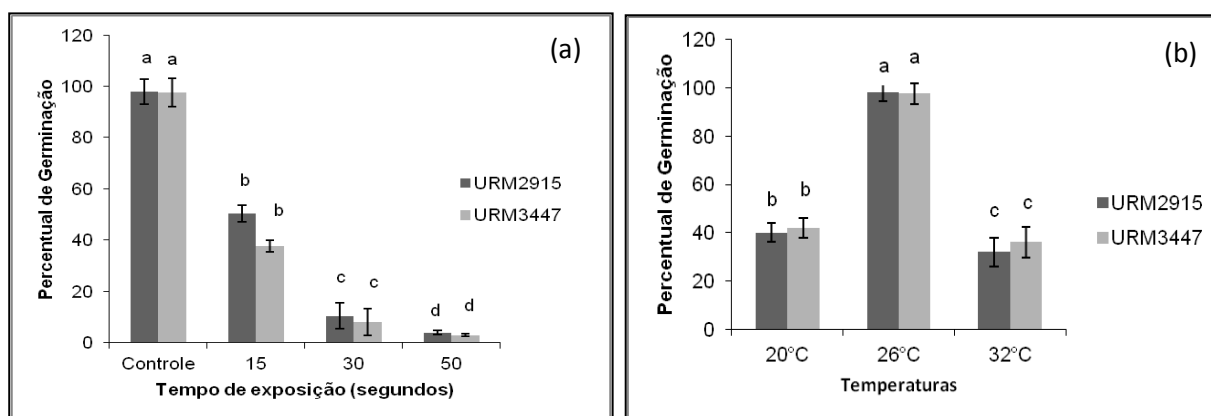


Figura 1: Percentual de germinação de *Beauveria bassiana* (URM2915 e URM3447) após exposição à luz UV (a) e após incubação em diferentes temperaturas (b). Colunas seguidas da mesma letra, entre diferentes tempos (a) e temperaturas (b), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

A germinação das duas linhagens também sofreu interferência das temperaturas utilizadas nos experimentos, contudo não houve diferença significativa entre as duas ($F=0,009$; $df= 1$; $p<0,05$). O melhor desenvolvimento de *B. bassiana* foi a 26°C, enquanto que a 32°C as linhagens revelaram a menor germinação (Figura 1). Como foi revelado em experimentos de Alexandre et al. (2006), conídios de *B. bassiana* submetidos a 32°C não germinaram.

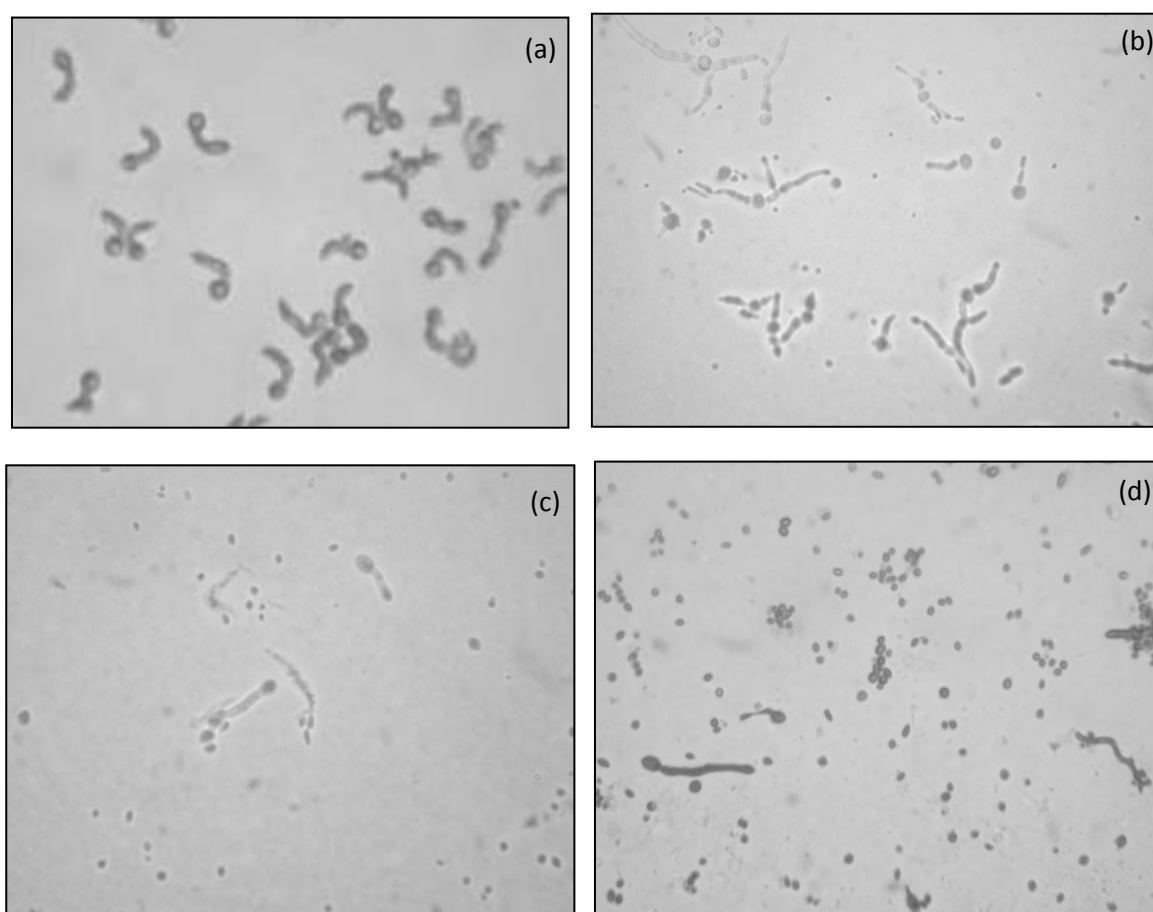


Figura 2: Germinação dos conídios de *Beauveria bassiana* URM2915 após 24h de incubação, sem exposição à luz UV (a) e após exposição de 15 (b), 30 (c) e 50 segundos (d).

BOUAMAMA et al. (2010) submeteram conídios de *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown & Smith a três regimes de temperatura e umidade, simulando as condições microclimáticas de regiões temperadas (43%UR e 28°C a 98% UR e 15°C), subtropicais (75% UR e 35°C a 98% UR e 25°C), e áridas (13% UR e 40°C a 33% UR e 15°C). A germinação, contagem de colônias e virulência contra larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) foram menos afetadas sob as condições temperadas. Os autores ainda relataram que a capacidade de tolerar altas ou baixas temperaturas pode estar envolvida com a origem geográfica de cada linhagem.

A luz UV interferiu mais na germinação do que a temperatura, pois os menores percentuais de germinação foram de 04 e 03%, após exposição a 50 segundos, e de 32 e 36% quando incubados a 32°C. Isto aconteceu possivelmente devido ao efeito deletério que a luz UV exerce sobre os conídios dos fungos (Fargues et al., 1996; Rangel et al., 2005).

3.2 Esporulação

A esporulação foi significativamente afetada pela luz UV ($F=40,10$; $df= 3$; $p<0,05$) e pela linhagem ($F=20,23$; $df=1$; $p<0,05$). *Beauveria bassiana* URM3447 mostrou esporulação superior a *Beauveria bassiana* URM2915, apenas após 30 segundos de exposição. O maior valor foi obtido no tratamento controle da URM3447 ($1,5 \times 10^7$ conídios/mL) e o menor foi da *Beauveria bassiana* URM2915 ($0,64 \times 10^7$), após 50 segundos de exposição. Nas duas linhagens não houve diferença entre os tempos de 15 e 30 segundos (Tabela 1). Embora as linhagens tenham apresentado boa esporulação mesmo após a exposição à luz UV, os efeitos da mesma podem ser vistos em estágios posteriores, como no atraso ou na diminuição da germinação. Como relata

a literatura, a presença de vários conídios na cutícula do hospedeiro não garante o sucesso da infecção fúngica, pois esta depende da formação dos apressórios e da produção de enzimas, que só é possível após a germinação conidial (St Leger, 1995; Alves & Lecuona, 1998).

Tabela 1: Esporulação de *Beauveria bassiana* (URM2915 e URM3447) após diferentes tempos de exposição à luz UV

Linhagens	Sem exposição	Tempos (segundos)		
		15	30	50
URM2915	1,2* aA	1,0 aAB	0,91 bB	0,64 aC
URM3447	1,5 aA	1,13 aB	1,21 aAB	0,75 aC

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e letras maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Médias são multiplicadas por 1×10^7 .

A temperatura também interferiu na esporulação de *Beauveria bassiana* (URM2915 e URM3447). A esporulação foi estimulada pela baixa temperatura, pois foi melhor a 20°C, entretanto não houve diferença significativa entre 26 e 32°C (Tabela 2). *Beauveria bassiana* URM3447 produziu mais conídios do que a *Beauveria bassiana* URM2915 a 20 e a 32°C, sem diferença estatística quando submetidas a 26°C. Tefera & Pringle (2003) observaram que a esporulação de *B. bassiana* em cadáveres de *C. partellus* foi maior a 15 e a 20°C, diminuindo significativamente com o aumento da temperatura. Alexandre et al. (2006) demonstraram que dois isolados de *B. bassiana* não foram capazes de produzir conídios a 32°C, e a 26°C a produção foi de $0,7 \times 10^8$,

maior do que a obtida com a URM2915 e a URM3447. Estes resultados reforçam a grande variabilidade existente entre as linhagens fúngicas e a necessidade de seleção. Ment et al. (2010) estudaram pela primeira vez a influência da temperatura no desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok sobre ovos de carrapato e mostraram que a elevada temperatura (30°C) interferiu diretamente na biologia do fungo, uma vez que deixou de produzir conídios e passou a produzir clamidosporos, mesmo dentro do inseto.

Tabela 2: Esporulação de *Beauveria bassiana* após 10 dias de incubação em diferentes temperaturas

Linhagens	20°C	26°C	32°C
URM2915	2,16* bA	1,11 aB	0,92 bB
URM3447	2,5 aA	1,13 aB	1,2 aB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e letras maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Médias são multiplicadas por 1×10^7 .

3.3 Crescimento radial

Beauveria bassiana URM2915 teve seu crescimento afetado em todos os tempos de exposição à luz UV, que diferiu estatisticamente entre si e entre o grupo controle. O crescimento diminuiu com o aumento do tempo de exposição, variando de 6,7 a 5,4 cm. Já o crescimento da *Beauveria bassiana* URM3447 apresentou diferença apenas entre o grupo controle e os tempos de exposição, porém não foi observada diferença quando foi

analisado, apenas os tempos. No grupo controle, o tamanho da colônia foi de 5,8 cm, enquanto que no maior tempo de exposição foi de 5,3 cm (Figura 3).

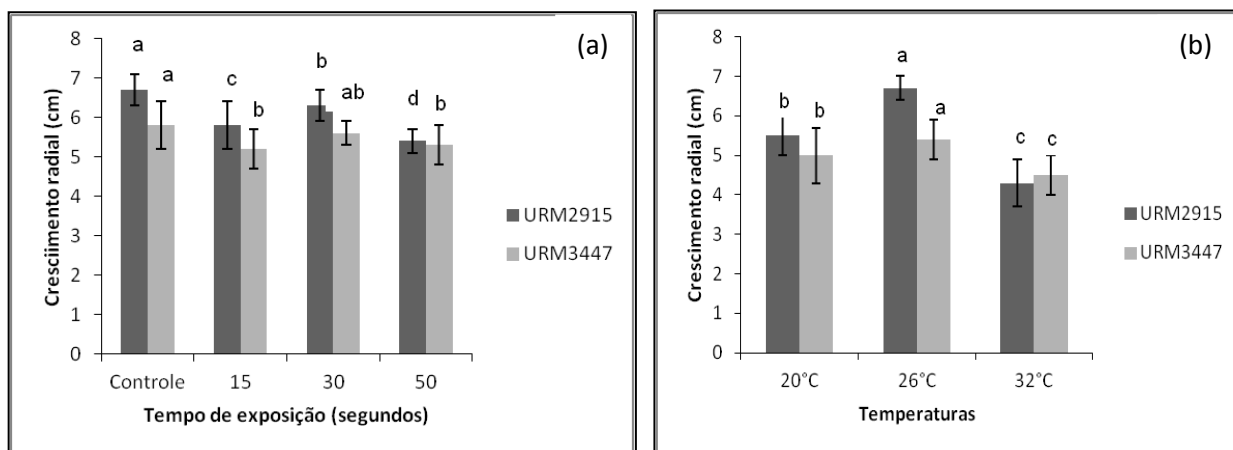


Figura 3: Crescimento radial de *Beauveria bassiana* (URM2915 e URM3447) após exposição à luz UV (a) e após incubação em diferentes temperaturas (b). Colunas seguidas da mesma letra, entre linhagens, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Existiu também diferença estatística entre o crescimento apresentado pelas duas linhagens ($F=74,667$; $df=1$; $p < 0,05$), sendo que a *Beauveria bassiana* URM2915 apresentou melhor desenvolvimento. Deste modo, o crescimento é afetado pelo tempo de exposição à luz UV e pela linhagem empregada, havendo interação significativa entre as linhagens e o tempo de exposição ($F=55,11$; $df=3$; $p < 0,05$).

Quanto ao efeito da temperatura, o crescimento das duas linhagens sofreu a mesma interferência. Entretanto, houve diferença significativa entre o crescimento apresentado pelas linhagens a 20 e a 26°C ($F=52,195$; $df=1$; $p < 0,05$). A melhor

temperatura de desenvolvimento de *B. bassiana* foi a 26°C, enquanto que a 32°C as linhagens revelaram o menor crescimento, indicando que esta temperatura afetou seu desenvolvimento e reduziu o crescimento em até 21% (Figura 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Hallsworth & Magan (1999) e Alexandre et al. (2006) que verificaram que a melhor faixa de desenvolvimento de *B. bassiana* está entre 25 e 28°C. Brooks et al. (2004) analisaram o efeito da temperatura sobre linhagens de *M. anisopliae* provenientes de vários países e observaram que o melhor crescimento foi obtido a 28 e 30°C. Sob temperatura de 32°C houve diminuição no crescimento e a 37,5°C, apenas isolados da França e do Brasil conseguiram se desenvolver, porém o crescimento foi menor (5mm).

De acordo com Dimbi et al. (2004), a temperatura não só afeta a fisiologia do fungo e do inseto, como também interfere na habilidade do fungo em infectar o inseto. Deste modo, a seleção de isolados fúngicos tolerantes à luz UV e a faixas de temperatura, encontrada no ecossistema da cultura alvo, é essencial para que os patógenos possam ser utilizados em programas de manejo de pragas (Braga et al., 2004; Bugeme et al., 2009).

4. Conclusões

A luz UV interfere mais na germinação dos conídios do que na esporulação ou crescimento radial. O melhor desenvolvimento de *B. bassiana* é a 26°C, sendo afetado significativamente a 32°C. *Beauveria bassiana* URM2915 mostra maior tolerância à luz UV e maior desenvolvimento nas três temperaturas do que a *Beauveria bassiana* URM3447.

5. Referências

ALEXANDRE, T.M.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H.; ALVES, L.F.A. Controle associado de *Alphitobius diaperinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e inseticidas químicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, p.481-489, 2008.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E., 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p. 97-170. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ. 1163 p.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M.; ALMEIDA, J.E.M.; LARANJEIRO, A.J. Equipamentos para aplicação de inseticidas microbianos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. p.269-287.

BUGEME, D.M.; KNAPP, M.; BOGA, H.I.; WANJOYA, A.K.; MANIANA, N.K. Influence of Temperature on Virulence of Fungal Isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathologia*, v.167, p.221-227, 2009.

BOUAMAMA, N.; VIDAL, C.; FARGUES, J. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.105, p.139-44, 2010.

BRAGA, G.U.; RANGEL, D.E.; 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*, v. 94, p. 912-920, 2002.

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

CRUZ, I. 2007. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. EMBRAPA-CNPMS, *Circular técnica*, v. 90, 12p.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, v. 49, p. 83–94, 2004.

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

FERNANDES, E.K; RANGEL, D.E.; MORAES, A.M.; BITTENCOURT, V.R.; ROBERTS, D.W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, p. 237-43, 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba, FEALQ. 2002.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. Fungi. In: *Field manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.255-282.

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

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M.S. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biological Control*, v. 7, p.131–139, 1996.

LUZ, C.; FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of the an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, v. 138, p. 117-125, 1997.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). *Ciencia Rural*, Santa Maria, v. 34, 2004.

MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biology*, v. 114, p. 49-56, 2010.

NUÑEZ-GAONA, O., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., ALATORRE-ROSAS, R., LOERA, O. Effect of Moisture Content and Inoculum on the Growth and Conidia Production by *Beauveria bassiana* on Wheat Bran.. *Brazilian Archives of Biology and Technology* - 2010 v.53 p.771-777

ORTU, S.; COCCO, A.; DAU, R. Evaluation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain ATCC 74040 for the management of *Ceratitis capitata*. *Bulletin of Insectology*, v. 62, p. 245-252, 2009.

OTTATI-DE-LIMA, E.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M ; GASSEN, M.H.; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, A.M.B. de; ZAPPELLINI, L.O. Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, p.651-659, 2010.

RANGEL, D.E.; BRAGA, G.U.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 88, p.116-125, 2005.

SILVA, A.S.F. de, AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produção Agropecuária*, v.4, p.71-78, 2002.

ST. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, v.73, p.1119-1125, 1995.

TEFERA, T.; PRINGLE, K.L. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.84, p. 90–95, 2003.

TOSCANO, L.C.; SCHLICK-SOUZA, E.C.; MARTINS, G.L.M.; SOUZA-SCHLICK, G.D.; MARUYAMA, W.I. Controle do cupim de montículo (Isoptera: Termitidae) de pastagem com fungos entomopatogênicos. *Revista Caatinga*, v. 23, p. 6-11, 2010.

UNICA. **Setor Sucroenergético - Mapa da Produção**. Disponível em:

<<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode={D6C39D36-69BA-458D-A95C-815C87E4404D}>> Acesso em: 30 out. 2010.

VANMATHI, J.S.; LATHA, C.P.; SINGH, A.J.A.S. Impact of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on stored grains pest, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Biopesticides*, v. 4, p. 194-197, 2011.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- O método de infecção de *Beauveria bassiana* interfere na mortalidade das larvas de *Diatraea saccharalis*;
- A mortalidade por meio da aplicação direta é maior do que quando as larvas se alimentam de colmos com o fungo;
- As enzimas degradadoras de cutícula (Pr1, Pr2 e quitinase) são estimuladas por componentes específicos da cutícula das larvas;
- Há correlação positiva entre a mortalidade causada por *Beauveria bassiana* e a produção das enzimas degradadoras de cutícula;
- *Beauveria bassiana* URM2915 é eficazmente transmitida entre as larvas de *Diatraea saccharalis*, indicando que a transmissão horizontal pode ser utilizada como estratégia no controle biológico dessa praga;
- A temperatura interfere na mortalidade causada por *Beauveria bassiana*;
- A germinação de *Beauveria bassiana* sofre mais interferência da luz UV do que a esporulação ou o crescimento radial;
- A esporulação é estimulada pela baixa temperatura, enquanto que o crescimento radial é inibido quando submetido à temperatura elevada.