

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

CARLOS FERNANDO RODRIGUES GUARANÁ

**AÇÃO PATOGÊNICA DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*  
SOBRE *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA:BRUCHIDAE),  
E COMPATIBILIDADE QUÍMICA A INSETICIDAS**

RECIFE, PE - BRASIL

2007

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

**AÇÃO PATOGÊNICA DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*  
SOBRE *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA:BRUCHIDAE),  
E COMPATIBILIDADE QUÍMICA A INSETICIDAS**

Autor: Carlos Fernando Rodrigues Guaraná  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elza Áurea de Luna-Alves Lima  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Auristela Correia de Albuquerque

**RECIFE, PE - BRASIL**

**2007**

**CARLOS FERNANDO RODRIGUES GUARANÁ**

**AÇÃO PATOGÊNICA DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*  
SOBRE *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA:BRUCHIDAE),  
E COMPATIBILIDADE QUÍMICA A INSETICIDAS**

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, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Profa. Dra. Elza Áurea de Luna-Alves Lima

Co - Orientadora: Profa. Dra. Auristela Correia de Albuquerque

**RECIFE, PE - BRASIL**

**2007**

**GUARANÁ, Carlos Fernando Rodrigues**

**Ação patogênica de linhagens de *Metarhizium anisopliae* sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), e compatibilidade química a inseticidas / Carlos Fernando Rodrigues Guaraná. – Recife: O Autor, 2007.**

**102p.: il.**

**Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia ) – UFPE. CCB**

**1. Controle biológico 2. Metarhizium anisopliae 3. Inseticidas 4. Vigna unguiculata. I. Título**

**632.937  
579.9**

**CDU (2ª. Ed.)  
CDD (22ª. Ed.)**

**UFPE  
CCB – 2007 – 133**

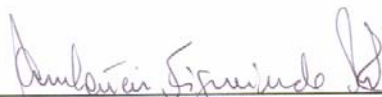
**AÇÃO PATOGENICA DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*  
SOBRE *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA:BRUCHIDAE),  
E COMPATIBILIDADE QUÍMICA A INSETICIDAS**

**Carlos Fernando Rodrigues Guaraná**

**Aprovado com Distinção**  
por unanimidade pela  
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elza Áurea de Luna-Alves Lima (UFPE)



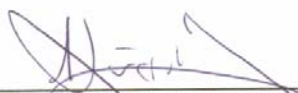
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Figueiredo Porto (UFRPE)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta (UFPE)



Prof. Dr. Ricardo Yara (UFPE)



Prof. Dr. João Lúcio Azevedo (UMC/SP)

À Isabel Francisca da Luz Guaraná,  
Arthur Carlos Luz Guaraná e  
Ayrton Carlos Luz Guaraná,  
minha esposa e meus filhos  
pelo amor e carinho em todos os meus dias.

DEDICO

A minha mãe Regina Rodrigues Guaraná,  
Mulher forte, que me deu a vida e me ensinou a viver,  
A ser quem eu sou.

Ao meu pai Fernando Airton Guaraná

OFEREÇO

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus que me ilumina, por me conceder os dons e as bênçãos necessárias que me permitiram alcançar mais este objetivo em minha vida;

À Isabel Francisca Luz Guaraná, minha amada esposa que esteve comigo em todos os momentos, pelo carinho familiar e apoio incontestado no decorrer de nossas vidas.

Aos meus filhos Arthur e Ayrton; pelo carinho e aprendizagem gratificante em convívio me fazendo um homem feliz.

À Regina Rodrigues Guaraná, minha mãe, sua luta e sua decisão me trouxeram até aqui.

Ao meu tio André Luiz Guaraná, por me presentear, ainda na graduação, com o primeiro exemplar de Controle Microbiano de Insetos, útil na minha formação e por diversas vezes citados nesta Tese.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio e liberação para realização do doutoramento;

À Universidade Federal de Pernambuco, pela contribuição e apoio a minha formação profissional;

À Profa. Dra. Elza Áurea de Luna-Alves Lima, minha orientadora, uma grande mulher, implacável algumas vezes, que cultivou em mim a admiração, respeito, e afeto e cujos ensinamentos foram essenciais para a finalização deste trabalho;

À Micoteca-URM da UFPE, na pessoa da Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, pela concessão das linhagens utilizadas no trabalho;

Ao Prof. Marcelo de Ataíde Silva, pelo apoio, amizade e companheirismo demonstrado desde os primeiros tempos de Universidade Rural;

Ao Prof. Dr. Francisco Braga da Paz Júnior, um amigo e companheiro nas lutas no doutorado, pelo apoio e amizade demonstrados no decorrer da pesquisa;

À Profa. Dra. Lady Mary Caraciolo Maia, amizade e apoio em forma de ser humano.

À Profa. Dra. Rejane Pimentel, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Laura Mesquita de Paiva e Profa. Dra. Ângela Coimbra dos Santos, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pela amizade e incentivo.

Ao Pesquisador do Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco – IPA, Venézio Felipe dos Santos pela grande ajuda na análise estatística em minha pesquisa;

Às meninas da secretaria do Doutorado pelo apoio e dedicação para com todos que as procuram, em especial Adenilda Eugenia, um ser humano ímpar em gentileza e em servir.

Aos meus amigos do Doutorado em ordem alfabética: Adália Cavalcanti Mergulhão, Ana Emília Barros e Silva, Andréa de Fátima Silva Santos, Daisi Gloria Farias Barbosa, Daniel Tarciso Martins Pereira, Eduardo Magalhães, Fernando Teles, Flávia Fabianny de Araújo, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Jr., Mário Correia da Silva, Norma Suely Evangelista Barreto, Paulo Roberto Eleutério de Souza e a extra Mabel Calina, alguns pelos



breves momentos vividos outros pela grande amizade que se formou e pelas inesquecíveis reuniões da GM em “nosso” Sítio.

Aos meus colegas de laboratório: Ana Paula Duarte, Virginia Svedese, Rosineide Lopes e Patrícia Pires, pela convivência harmoniosa e trabalho em grupo durante a pesquisa;

Aos estagiários e amigos: Antonio Oliveira; Emilly Sara e Carla. Seres humanos importantes no desenvolvimento da presente pesquisa;

Aos colegas, professores e administrativos, da Área de Ecologia e do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela convivência harmoniosa e prestativa;

Aos meus Avós in memoriam Albertina e José, Amaltéa e Ayrton, minhas irmãs, Regiane, Cristiane e o marido Ivanildo, meus sobrinhos Mariane e Matheus, todos os tios, tias, primos e antepassados, pela força e perseverança com que lutaram para a formação e desenvolvimento de nossas famílias: Rodrigues da Costa e Guaraná.

A família à qual eu me agreguei, Raimundo (in memoriam) e Francisca Eva, os pais de meu amor, os cunhados e suas esposas: José e Jesualda, Joaquim e Liriane, Francisco e Fátima, Luis e Isabela, Antônio e Maria Sandra, e os sobrinhos: Guilherme, Gustavo, Thiago, Paula, Luanna. Liadinna, Liliann, Gabriel e Diogo, pelos alegres momentos de convivência no seio da família Evêncio.

A todos aqueles que me esqueci de citar nominalmente, e que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente, para o sucesso do meu curso de doutoramento em Ciências Biológicas, o meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                                                                                                                                                                              | X    |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                                                                                                                                                              | XII  |
| RESUMO .....                                                                                                                                                                                                                                                                        | XIV  |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | XV   |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 01   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 05   |
| 2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i><br>var. <i>acridum</i> : aspectos taxonômicos e biológicos .....                                                                                                                          | 05   |
| 2.2. Controle biológico de insetos–praga .....                                                                                                                                                                                                                                      | 08   |
| 2.2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin .....                                                                                                                                                                                                  | 08   |
| 2.2.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> Driver, Milner & Trueman .....                                                                                                                                                                                              | 17   |
| 2.3. Aspectos biológicos e taxonômicos de <i>Callosobruchus maculatus</i> .....                                                                                                                                                                                                     | 20   |
| 2.4. O controle biológico do <i>Callosobruchus maculatus</i> .....                                                                                                                                                                                                                  | 22   |
| 2.5. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos em associação<br>com inseticidas químicos .....                                                                                                                                                                                    | 25   |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                                                                                                                 | 30   |
| 4. CAPÍTULOS .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 52   |
| <br>CAPÍTULO I – <b>Compatibilidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> var.<br/><i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> com Inseticidas<br/>Químicos Utilizados para o Controle do <i>Callosobruchus maculatus</i><br/>(Coleoptera:Bruchidae).</b> .... | 53   |
| <b>Abstract</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 55   |
| <b>Resumo</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 56   |
| <b>Introdução</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 57   |
| <b>Material e Métodos</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 59   |

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| Linhagens fúngicas .....                           | 59        |
| Inseticidas utilizados .....                       | 59        |
| Mensuração do crescimento micelial .....           | 59        |
| Produção de conídios e análise de germinação ..... | 60        |
| Toxicidade dos produtos químicos .....             | 61        |
| Análise estatística .....                          | 61        |
| <b>Resultados e Discussão .....</b>                | <b>62</b> |
| <b>Agradecimentos .....</b>                        | <b>70</b> |
| <b>Referencias .....</b>                           | <b>71</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO II – Patogenicidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Driver &amp; Milner no controle do <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabr.) (Coleoptera:Bruchidae).</b> |           |
| <b>Abstract .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                | <b>75</b> |
| <b>Resumo .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>77</b> |
| <b>1. Introdução .....</b>                                                                                                                                                                                                                                           | <b>78</b> |
| <b>2. Material &amp; Métodos .....</b>                                                                                                                                                                                                                               | <b>81</b> |
| 2.1 Linhagens fúngicas utilizadas .....                                                                                                                                                                                                                              | 81        |
| 2.2 Obtenção e criação dos insetos .....                                                                                                                                                                                                                             | 81        |
| 2.3 Preparo das suspensões fúngicas .....                                                                                                                                                                                                                            | 82        |
| 2.4 Teste de Patogenicidade .....                                                                                                                                                                                                                                    | 82        |
| 2.5 Reisolamento dos patógenos .....                                                                                                                                                                                                                                 | 83        |
| 2.6 Análise estatística .....                                                                                                                                                                                                                                        | 83        |
| <b>3. Resultados &amp; Discussão .....</b>                                                                                                                                                                                                                           | <b>84</b> |
| <b>4. Referências Bibliográficas .....</b>                                                                                                                                                                                                                           | <b>92</b> |
| <b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                    | <b>96</b> |
| <b>6. ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                               | <b>97</b> |

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Inseto adulto de <i>Callosobruchus maculatus</i> infectado por <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> URM3349. ....                                                                                                                      | 16 |
| Figura 2. Inseto adulto de <i>Callosobruchus maculatus</i> infectado por <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> URM4412. ....                                                                                                                         | 16 |
| Figura 3. Caruncho <i>Callosobruchus maculatus</i> na fase adulta .....                                                                                                                                                                                         | 21 |
| Figura 4. Ciclo biológico de <i>Callosobruchus maculatus</i> . a) fêmeas ovopositando sobre os feijões; b) feijão infestado com ovos; c) janela de emergência do adulto; d) inseto adulto saindo de dentro do feijão; e) acasalamento (à esquerda, macho) ..... | 21 |

### CAPÍTULO I – **Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* com Inseticidas Químicos Utilizados para o Controle do *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae).** .....

|                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estimativas de crescimento de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM3349, e <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM4412, independentemente do inseticida utilizado, em função do tempo. .... | 65 |
| Figura 2. <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM3349 crescidos a 28±2°C, 12 horas de fotofase e UR 75 ± 5%, em BDA + inseticidas, após 12 dias. ....                                                        | 68 |
| Figura 3. <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM4412 crescidos a 28±2°C, 12 horas de fotofase e UR 75 ± 5%, em BDA + inseticidas, após 12 dias. ....                                                           | 69 |

**CAPÍTULO II – Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver, Milner & Trueman no controle do *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera:Bruchidae).** .....

|                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Comparação dos percentuais médios de mortalidade entre as linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM3349 e <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM4412 em função do tempo no decorrer de onze dias após inoculação dos fungos. .... | 86 |
| Figura 2. Percentual médio de mortalidade acumulada de <i>Callosobruchus maculatus</i> em função das concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (URM3349) e do tempo após a inoculação nos insetos. ....                                           | 88 |
| Figura 3. Percentual médio de mortalidade acumulada de <i>Callosobruchus maculatus</i> em função das concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (URM4412) e do tempo após a inoculação nos insetos. ....                                              | 91 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I – <b>Compatibilidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> com Inseticidas Químicos Utilizados para o Controle do <i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera:Bruchidae).</b> .....                                                           |    |
| Tabela 1. Inseticidas químicos, registrados para a cultura do caupi, utilizados nos testes de compatibilidade com <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM3349, e <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM4412.....                                                                                        | 60 |
| Tabela 2. Comparação dos valores médios do crescimento micelial das linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM3349, e <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM4412 e tratamentos em intervalos de tempo.....                                                                                    | 62 |
| Tabela 3. Percentual de germinação dos conídios (média ± desvio padrão), área da colônia (média ± desvio padrão), após 12 dias de inoculação, e numero de conídios produzidos por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> URM3349 crescidos a 28±2°C e 12 horas de fotofase, adicionados com inseticidas....      | 64 |
| Tabela 4. Percentual de germinação dos conídios (média ± desvio padrão), área da colônia (média ± desvio padrão), após 12 dias de inoculação, e número de conídios produzidos por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> URM4412 crescidos a 28±2°C e 12 horas de fotofase em meio adicionados com inseticidas..... | 66 |
| Tabela 5. Toxicidade e compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados em culturas de caupi para <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em condições de laboratório.....                                                                              | 67 |

CAPÍTULO II – Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver, Milner & Trueman no controle do *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera:Bruchidae). .....

Tabela 1. Percentual médio de mortalidade de *Callosobruchus maculatus* tratados em diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, independente da linhagem estudada.. ..... 84

## RESUMO

Foram analisadas duas linhagens de *Metarhizium anisopliae* quanto à patogenicidade sobre insetos adultos de *Callosobruchus maculatus* utilizando as concentrações  $10^8$  a  $10^4$  conídios/mL<sup>-1</sup>, sendo a virulência determinada pelo percentual de mortalidade, decorridos dos doze dias de observação. Os isolados mostraram-se altamente patogênicos, provocando mortalidade superior a 50% da população de insetos já no terceiro dia após a inoculação. Os isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 foram agressivas ao inseto-alvo, tendo o isolado de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 comportamento mais agressivo, sugerindo sua utilização em programas de controle biológico do caruncho do caupi. Foi avaliado, *in vitro*, o efeito fungitóxico de produtos fitossanitários utilizados em culturas de feijão, sobre o crescimento vegetativo e a conidiogênese nas linhagens de *M. anisopliae*. Independentemente do inseticida utilizado, o isolado *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, foi a que apresentou maior taxa de crescimento, enquanto o isolado *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 apresentou maior efeito inibitório no crescimento micelial. A compatibilidade dos isolados de *M. anisopliae* variou amplamente dentro de cada linhagem e entre os inseticidas estudados, sendo Quimióleo (azadiractina) o produto que apresentou o maior efeito fungitóxico e *M. anisopliae* var. *acridum* URM 4412 o fungo mais sensível ao efeito dos defensivos agrícolas. As linhagens, em associação aos inseticidas utilizados, podem ser recomendadas para o Manejo Integrado de Praga do Caupi.

**Palavras-chave:** *Metarhizium anisopliae*, controle microbiano, inseticidas, compatibilidade, *Vigna unguiculata*, caupi.



## ABSTRACT

Two strains of *Metarhizium anisopliae* was analyzed for the pathogenicity on adult insects of *Callosobruchus maculatus* using the concentrations of  $10^8$  to  $10^4$  conidia.mL<sup>-1</sup> and the virulence determined by the percentage of mortality, passed of twelve days of observation. The isolated were highly pathogenic provoking mortality upper than 50% of the insects' population in the third day after the inoculation. The isolated of *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 and *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 were aggressive to the insect-target, and the isolated of *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 was more aggressive suggesting its using in programs of biological control to the woodworm of the caupi. It was evaluated, *in vitro*, the fungitoxic effect of phytosanitary products used in cowpea cultures affected by the vegetative growth and conidiogenesis of the isolated of *M. anisopliae*. Independently of the used insecticide, the isolated *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 was the one that showed greater growth ratio, while the isolated *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 showed greater inhibitory effect in the mycelial growth. The compatibility of the isolated of *M. anisopliae* varied widely in each lineage and among the studied insecticides, being Chemioil (azadiractina) the product that showed the greater fungitoxic effect and *M. anisopliae* var. *acridum* URM 4412 was the fungi more sensitive to the agricultural defensive effect. The isolated, depending on the insecticide, can be recommended for the Integrated Pest Management of Cowpea.

**Word-key:** *Metarhizium anisopliae*, microbial control, insecticides, compatibility, *Vigna unguiculata*, Cowpea.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão-macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma planta da família Fabaceae que representa uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média), apresentando todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) e como todo vegetal, não conter colesterol. Representa um alimento básico para as populações de baixa renda do nordeste brasileiro. Apresenta ciclo curto, baixa exigência hídrica e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade e, por meio da simbiose com *Rhizobium*, que tem a habilidade para fixar nitrogênio do ar (ANDRADE JUNIOR et al. 2005).

O Brasil se situa como maior produtor de feijão caupi apresentando uma produção anual na faixa de dois milhões de toneladas, equivalente a 20% da produção mundial (ARAGÃO et al., 1998; TOMÉ et al., 2001). Estimativas das perdas da produção total do feijão no Brasil giram em torno de 30% devido ao ataque de insetos durante o armazenamento (STONEL & SARTORATO, 1994).

*Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae), conhecido na Região Nordeste como caruncho do feijão, ocorre em todos os

locais do mundo onde se cultiva esta planta, sendo considerado a principal praga de *V. unguiculata* armazenado, pois reduz o peso, a qualidade dos grãos, o poder germinativo e a qualidade das sementes (DONGRE et al., 1996), podendo gerar perdas no armazenamento de até 90% (SECK et al., 1991).

O método de controle mais empregado contra os carunchos é o químico. Existem vários produtos fitossanitários que estão sendo comercializados para o uso na cultura do feijoeiro. Entretanto esses produtos fitossanitários caracterizam-se por apresentarem elevada toxicidade e baixa seletividade aos inimigos naturais (KOVALESKI & RIBEIRO, 2003; QUINTELA & FERREIRA 2006), gerando vários problemas, inclusive a resistência a inseticidas. O surgimento de pragas secundárias que inibem os inimigos naturais, o aumento de riscos para a saúde humana, a contaminação de nascentes e a diminuição da biodiversidade (ALVES et al., 1998; MELO & AZEVEDO, 2000; AZEVEDO, 2001; LACEY et al., 2001; MARQUES et al., 2004). Em função dos avanços das pesquisas e de uma conscientização maior dos problemas advindos com o uso intensivo de inseticidas (NORA & HICKEL, 1997) e o elevado custo desses defensivos agrícolas, o controle biológico assume papel cada vez mais importante no Manejo Integrado de Pragas (CRUZ, 2002).

O emprego de produtos químicos no controle de doenças do feijoeiro implica em múltiplas pulverizações que elevam substancialmente o

custo da produção. Além disso, os resultados, às vezes, indicam apenas sucesso limitado (VIEIRA, 1988). O uso indiscriminado desses produtos deixa resíduos de elevada toxicidade (KOVALESKI & RIBEIRO, 2003). Portanto, o controle biológico com fungos entomopatogênicos surge com alternativa para a redução da densidade populacional de pragas agrícolas. (KAAYA, 1989; TEFERA & PRINGLE, 2003). Dentre os fungos entomopatogênicos, destaca-se *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, visto o sucesso alcançado como controlador de insetos pragas, tais como *Schistocerca pallens* (MOREIRA et al., 1996), *Heterotermes tenuis* (MOINO JÚNIOR & ALVES, 1998), *Castnia licus* (FIGUEIREDO et al., 2002), *Blatella germanica* (QUESADA-MORAGA et al., 2004), *Hoplia philamthus* (ANSARI et al., 2004), *Nasutitermes coxipoensis* (ALBUQUERQUE et al., 2005), *Tribolium confusum* (MICHALAKI et al. 2006), *Ceratitis capitata* (MOCHI et al. 2006) entre outros.

A possibilidade de se utilizar o manejo integrado, associando ao fungo entomopatogênico com um inseticida químico, é viável e tende a ampliar a ação do controle da praga, reduzindo esta, a números aceitáveis para a agricultura. Trabalhos estão sendo feitos, cujos resultados apontam para a avaliação da interação entre linhagens de fungos entomopatogênicos, entre eles *M. anisopliae*, observando a compatibilidade entre algumas das linhagens testadas com inseticidas químicos (DAL BELLO et al., 2001).

Dentro desta perspectiva, este trabalho teve por objetivo avaliar em laboratório, o efeito de produtos fitossanitários utilizados em culturas de

feijão caupi sobre o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412, selecionar o melhor inseticida químico e o fungo para emprego no controle de *Callosobruchus maculatus*, visando fornecer subsídios para a escolha de produtos seletivos para o emprego no Manejo Integrado de Pragas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*: aspectos taxonômicos e biológicos

Metschnikoff, zoologista e patologista russo do final do século XIX, realizou os primeiros testes contra insetos e isolou o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* de larvas de *Anisoplia austriaca* (Coleoptera), nomeando-o primeiramente de *Entomophthora anisopliae*. Em 1883, Sorokin o reestudou e o considerou uma única espécie *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. (KENDRICK, 1971; LUNA-ALVES LIMA, 1989; FARIA & MAGALHÃES, 2001). Mais tarde Tulloch (1976) revisou o gênero e apresentou duas variedades, as quais foram separadas pelo tamanho dos conídios: *M. anisopliae* var. *anisopliae* que apresenta conídios curtos (3,5-9,0x5,0-3,0 µm) *M. anisopliae* var. *majus* de conídios mais longos (9,0-18,0x10,0-14,0 µm). O avanço das técnicas enzimáticas e da biologia molecular, adicionado aos estudos bioquímicos, complementados pelos morfológicos vieram modernizar a taxonomia fúngica, de modo que o gênero *Metarhizium* foi reavaliado. As relações filogenéticas do gênero *Metarhizium* foram estudadas por Rakotonirainy et al. (1994) utilizaram ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e com base nas seqüências 28.S do RNA ribossômico, consideraram três espécies *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album*.

Os estudos taxonômicos utilizando a biologia molecular se intensificaram. De modo que Driver et al. (2000) consideraram dez “clades” distintos que são revelados pelo cladograma, que tem como base as combinações das seqüências dos dados das regiões ITS e 28.S do DNA ribossômico, aliados aos marcadores RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*) e a morfologia dos conídios. Esses estudos revelaram o monopólio do grupo *M. anisopliae* e reorganizaram quatro “clades” dentro do grupo. Em dois incluíram *M. anisopliae* var, *anisopliae* e *M. anisopliae* var, *majus* e em outros dois descreveram duas variedades novas *M. anisopliae* var, *lepdium* e *M. anisopliae* var, *acridum*.

As análises sobre a filogenia utilizando seqüências da região do DNA ribossomal de *M. anisopliae* têm demonstrado que a região é muito conservada dentro do genoma. Todavia Mavridou et al. (2000) detectaram algumas variabilidades dentro da região do gene complexo 28.S do DNA ribossômico de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e procederam a identificação do grupo 1 *introns* em três diferentes posições do gene 28.S.

Estudos moleculares efetuados por Pantou et al. (2003), mostraram que *M. anisopliae* var. *anisopliae* é considerado o representante mais estudado e mais bem estabelecido dentro do gênero e que a região ITS é altamente preservada dentro do genoma. Esses resultados também confirmaram os trabalhos de Driver et al. (2000) sobre a reclassificação do

gênero, considerando *M. anisopliae* var. *anisopliae* e a nova variedade *M. anisopliae* var. *acridum*.

A taxonomia é dinâmica e com base nas características morfológicas e na sequência ITS do DNA ribossomal Liu et al. (2001) isolou em campo *Cordiceps brittlebankisoides* de larva de Coleoptera (Scarabaeidae) na China, e o relacionou com o anamorfo *M. anisopliae* var. *majus*.

Atualmente, os fungos imperfeitos são chamados de Anamorfos, e entre estes, estão a maioria dos entomopatogênicos. Alexopoulos et al. (1996) na última edição de “*Introductory Micology*” ainda consideraram o grupo na Subdivisão Deuteromycotina. Contudo esses fungos que não têm relação filogenética, não justificam a sua classificação na hierarquia taxonômica: Divisão, Subdivisão, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, este fato reforçou a aceitação pela comunidade micológica, da denominação de Anamorfo para o grupo o qual só apresenta a fase assexuada (KENDRICK, 1992).

No inseto, o ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos, inclusive *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresenta duas fases: uma sapróbia e outra parasitária. Na fase sapróbia, o ciclo pode se iniciar com a germinação de conídios, emitindo um ou mais tubos germinativos, que se diferenciam em hifas, que se conduzem num intrincado sistema de entrelaçamento, constituindo-se em micélio onde surgem os conidióforos. Na extremidade destes,



diferenciam-se as fiálides, que produzem no ápice, conídios (RIBEIRO et al., 1992 St. LEGER et al.,1991). Esses conídios germinam e formam apressórios (St. LEGER et al., 1989) os quais penetram no hospedeiro por ação mecânica e enzimática (St. LEGER et al., 1991; 1996; NAHAR et al., 2004). Na fase parasitária, os conídios no interior do inseto se diferenciam em estruturas leveduriformes, as quais secretam toxinas que invadem os tecidos do inseto. Após a morte do inseto, as hifas emergem formando conidióforos e conídios, que se dispersam e reiniciam o ciclo, fora do inseto (LUNA-ALVES LIMA, 1989; LUNA-ALVES LIMA & TIGANO, 1989; ALVES, 1998).

## **2.2. Controle biológico de insetos–praga**

A eficiência do controle biológico de insetos por fungos entomopatogênicos está diretamente relacionada com a esporulação, germinação, viabilidade, radiações solares, virulência e patogenicidade dos fungos sobre o inseto alvo, quando aplicado no campo.

### **2.2.1. *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Metsch.) Sorokin**

Os fungos que controlam os insetos são os agentes entomopatogênicos mais eficientes e empregados no Brasil. Segundo Azevedo (1998), o programa de controle biológico mais conhecido em todo o mundo, foi o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata*), no Nordeste do Brasil por *M. anisopliae*. Em 1965 os

primeiros resultados foram conhecidos (GUAGLIUMI et al., 1974) e foram tão importantes que 10 anos mais tarde (1975), laboratórios regionais foram instalados e as primeiras recomendações para o emprego de *M. anisopliae*, no campo foram feitas por Marques et al. (1981). Na ocasião esses trabalhos foram tão relevantes que já havia a implantação de 10 programas de controle biológico, elevando o Brasil a líder mundial na área. Cerca de 127 laboratórios estavam envolvidos no estudo, nos anos 90, nos quais trabalhavam 1.280 profissionais. No entanto, *Beauveria bassiana* é o fungo mais estudado, seguido de *M. anisopliae*, no que se referem aos estudos de laboratório e aplicação no campo (DIAS et al., 1994; ALVES & LECUONA, 1996).

*M. anisopliae* apresenta atividade patogênica contra vários insetos. É um fungo cosmopolita, geralmente isolado do solo e de várias espécies de diferentes Ordens de insetos. (QUINTELA & McCOY, 1997; 1998, SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998; KERSHAW et al., 1999). Todavia os estudos se intensificaram e Neves & Alves (2000) efetuaram bioensaio com *M. anisopliae* e *B. bassiana* visando o controle do cupim *Conitermes cumulans*. Observaram que *M. anisopliae* 1037 apresentou maior índice de mortalidade após nove dias de crescimento (89,2%) e maior produção de conídios ( $3,37 \times 10^{12}$  conídios/kg de arroz). O emprego desse fungo no controle biológico de *C. cumulans* foi mais eficiente do que *B. bassiana*, nas condições testadas.

Athayde et al. (2001) verificaram a patogenicidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre teleóginas de carrapatos *Boophilus microplus*, obtiveram

mortalidade superior a 90%, e demonstraram a potencialidade desses fungos para o controle biológico desse carrapato, embora *M. anisopliae* tenha apresentado maior eficiência nos bioensaios.

Samuels et al. (2002) estudaram a patogenicidade e a virulência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre ovos de *Blissus antillus*, que ataca *Brachiaria* e tem causado vários danos aos pastos. O controle desse inseto é feito principalmente com o emprego de inseticidas. O uso de fungos entomopatogênicos representa uma alternativa ao uso do agente químico. Os ovos foram inoculados sob condições controladas em laboratório, *M. anisopliae* foi altamente virulento para os ovos, enquanto *B. bassiana* foi considerado de baixa virulência ou avirulento. Os resultados indicaram que o emprego desses fungos no biocontrole representa uma estratégia viável para o controle desta peste.

Sun et al. (2002) quantificaram a esporulação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre cadáveres de cupim *Coptotermes formosanus*, “in vitro”. Observaram diferentes padrões de esporulação entre as duas espécies. Os isolados de *B. bassiana* foram incluídos no grupo com alta esporulação total pós-inoculação (11 dias) e baixa e rápida esporulação (dois a três dias), enquanto os isolados de *M. anisopliae* foram classificados em um outro grupo, caracterizados por apresentar alta e rápida esporulação e baixa esporulação total. Essas características apresentadas por *M. anisopliae* quando comparado com *B. bassiana* podem ser interpretado como uma vantagem para aplicação

no controle biológico desse cupim. A esporulação foi significativamente mais alta *in vitro* do que *in vivo* e apresentou correlação positiva.

Batta (2003) estudou a eficiência da viabilidade e da formulação de conídios de *M. anisopliae* testadas sobre ninfas de *Bremisia tabaci* e de *Tetranychus cinnabarinus*, com vista ao controle biológico destas moscas. Conídios em emulsão (água-e-óleo), um preparado de óleo de coco e de soja, foram empregados nas formulações. Esta mistura promoveu uma camada de emulsão mais estável (93%) e viscosidade mais baixa (27 cps). Os conídios do fungo permaneceram viáveis nesta formulação durante 30 meses com uma redução de 50% (meia-vida) na viabilidade depois de 4 meses a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Em comparação com os conídios secos nas mesmas condições, tornaram-se não viáveis após 2 meses, com uma meia-vida de 0,5 ao mês. Para ambas as espécies testadas, *B. tabaci* e *T. cinnabarinus*. Foram obtidos níveis significativamente mais altos de mortalidade quando foi comparado com os conídios na forma de emulsão e de conídios secos, no tratamento controle, tanto em condições de laboratório quanto em condições de campo. O fungo mostrou grande potencial para administração e sugere haver aumentado sua atividade quando aplicado na emulsão de óleo de coco e soja.

Liu et al. (2003) selecionaram cinco linhagens de *M. anisopliae* e mostraram a patogenicidade destas linhagens a *Lygus lineolaris*, através de estudos morfológicos, bioensaios em laboratório e aplicação no campo. Todas as linhagens foram altamente patogênicas. Esses dados foram relevantes na

seleção das linhagens e o seu desenvolvimento no campo mostrou eficiência como um agente de controle biológico desse percevejo.

Silva et al. (2003) com vistas ao controle biológico da traça das crucíferas *Plutella xylostella*, praga das crucíferas de ocorrência cosmopolita, que causa grande prejuízo as brássicas, no Brasil o repolho é o mais susceptível a essa praga. Foram testadas varias linhagens de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre lagartas desse inseto e verificaram que *M. anisopliae* foi mais virulento às lagartas do que *B. bassiana*. Os resultados indicaram que *P. xylostella* foi mais susceptível ao *M. anisopliae* e constatando o potencial desse fungo no manejo integrado desse inseto.

Sun et al. (2003) estudaram os efeitos da virulência, esporulação e temperaturas de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *Coptotermes formosanus* em laboratório, e observaram que a prevalência de doença afeta significativamente as populações desse inseto. Sendo que *M. anisopliae* nas três categorias estudadas (virulência, esporulação rápida, e esporulação total) foi mais eficiente do que *B. bassiana* em várias temperaturas testadas. Esses fungos apresentam características diferentes quanto à virulência, as quais devem ser consideradas quando da seleção do fungo e do inseto alvo para controle microbiano.

*M. anisopliae* é um fungo entomopatogênico que atinge uma ampla faixa de hospedeiros, inclusive barata. Quesada-Moraga et al. (2004)

realizaram teste sobre a virulência, transmissão horizontal e efeitos subletais reprodutivos de *M. anisopliae*, sobre a barata alemã, *Blattella germanica*. A percentagem de mortalidade alcançada foi de 87,5%, a  $TL_{50}$  foi 12,2 dias, esses dados indicaram a transmissão horizontal e a rápida velocidade de infecção dentro da população do inseto. Os efeitos das doses subletais mostraram uma redução na produção de ootecas e conseqüentemente no número de ninfas. Não obstante aos resultados obtidos, em condições de laboratório; os autores sugeriram que pesquisas em condições de campo sejam feitas, a fim de assegurar o sucesso da linhagem sobre a barata alemã, no monitoramento de programas de pesquisa.

Os raios ultravioletas solares (UV-A e UV-B) são os maiores fatores abióticos limitantes do sucesso de *M. anisopliae*, como agente de controle biológico. Rangel et al. (2004) testaram a velocidade de germinação e a produção de conídios de *M. anisopliae* sobre diferentes substratos artificiais e cadáveres de *Galleria mellonella*, como também a termotolerância dos conídios às variações dos raios ultravioletas do sol (UV-A e UV-B). Os resultados indicaram que o aumento da tolerância a radiações UV-B pode ser usado para obtenção de conídios e da germinação em menor tempo, permitindo maior persistência do fungo no solo.

Albuquerque et al. (2005) realizaram estudo sobre a ação da patogenicidade de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* sobre soldados e operários do cupim *Nasutitermes coxipoiensis*, em

laboratório. A mortalidade cumulativa de *N. coxipoiensis* com *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi maior do que a de *M. anisopliae* var. *acridum*; Esses resultados indicaram a potencialidade de *M. anisopliae* var. *anisopliae* no controle biológico dessa espécie de cupim.

A patogenicidade de *M. anisopliae* sobre o *C. maculatus* foi estudada por Cherry et al. (2005) em laboratório, que realizaram bioensaios por imersão, tendo obtido no sexto dia de observação, para o isolado de *M. anisopliae* estudado, percentuais de mortalidade acumulada não corrigida que variaram de 29,99 a 83,33%, sugerindo a possibilidade de utilização deste fungo para o controle do caruncho do feijão caupi (Figuras 1 e 2).

Loureiro et al. (2005) selecionaram linhagens de *M. anisopliae*, procedentes de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil, virulentas a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata*, em condições de laboratório, com potencial para o emprego no controle de ninfas. As quais foram pulverizadas com uma suspensão de conídios. A mortalidade foi avaliada diariamente e as linhagens que apresentaram mortalidade confirmada superior ou igual a 70% no 6º dia de observação, foram selecionadas. Os autores sugeriram que mesmo as linhagens que apresentaram alta patogenicidade, fossem testadas em outras características, principalmente a produção de conídios, antes das formulações de produtos para aplicação no controle de *M. fimbriolata*.

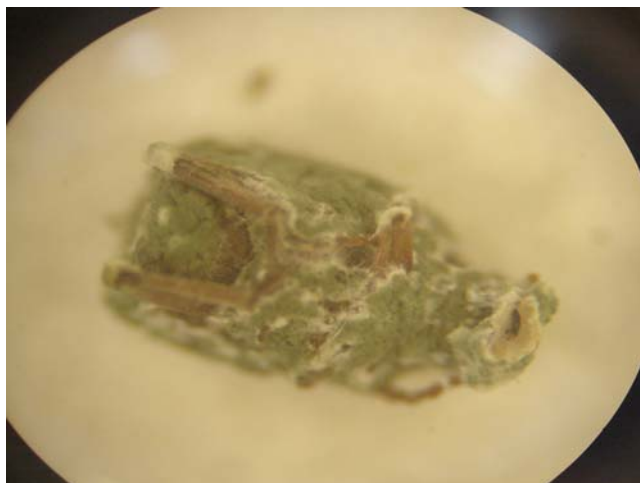
Loureiro & Moino Jr. (2006) avaliaram a patogenicidade de alguns fungos entomopatogênicos, inclusive *M. anisopliae* aos pulgões *Aphis gossypii*, e *Myzus persicae*, espécies cosmopolitas e polífagas que causam sérios prejuízos às plantas cultivadas. Entre os fungos estudados *M. anisopliae* e *B. bassiana* causaram 100% de mortalidade no 7º dia após a inoculação; já *Verticillium lecanii*, foi o que provocou mortalidade mais tardia, e o pulgão *M. persicae* foi o mais susceptível aos fungos testados do que *A. gossypii*. *M. anisopliae* foi considerado o fungo mais virulento, mesmo nas baixas concentrações testadas, confirmando sua plasticidade no que se refere as possibilidades de controle sobre espécies da Ordem Hemiptera.

Scholte et al. (2006) mostraram a infecção causada por *M. anisopliae* sobre o mosquito *Anopheles gambiae*, um vetor da malária na África, através da mortalidade das fêmeas adultas. As quais foram infectadas com diferentes doses de conídios em emulsão de óleo. As fêmeas infectadas apresentaram menor tendência à alimentação, de modo que quanto maior a dose, menor o apetite demonstrado. As fêmeas também apresentaram baixa fecundidade e menor produção de ovos por ciclo. A redução do apetite revelou um dado promissor para o controle desse mosquito, visto que a necessidade que as fêmeas têm para sugar o sangue, a fim de amadurecer os seus ovos, reduz a probabilidade do mosquito transmitir a malária.





**Figura 1.** Inseto adulto de *Callosobruchus maculatus* infectado por *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* URM3349.



**Figura 2.** Inseto adulto de *Callosobruchus maculatus* infectado por *Metarhizium anisopliae* var *acridum* URM4412.

### 2.2.2. *Metarhizium anisopliae* var *acridum* Driver, Milner & Trueman

*Metarhizium anisopliae* var *acridum* ocorre sobre várias espécies de Homoptera, Orthoptera e Coleoptera, embora raramente seja encontrado atacando insetos ou isolados do solo. Espécies da Ordem Orthoptera e da Família Acrididae são encontradas no Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, atacando gramíneas, cana-de-açúcar, arroz e milho causando sérios danos (ALVES, 1998). *Schistocerca pallens* ocorre no Nordeste em canaviais de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Alagoas. Já *Rammatocercus schistocercoides* durante a fase de ninfas ataca gramíneas (forrageiras) ocorre na região Centro-Oeste.

Os fungos são os agentes entomopatogênicos mais bem sucedidos como biocontroladores. Formulados a base de *M. anisopliae* var *acridum* e *B. bassiana* contra gafanhotos são empregados como medida de controle desses insetos, porém a maior limitação ao uso desses fungos é o tempo para matar os gafanhotos. Todavia sua ação apesar de ser lenta, causa mudanças fisiológicas importantes no hospedeiro, permitindo o emprego de estratégias de controle. Os insetos quando atacados pelo fungo perdem a mobilidade, de modo que se tornam presas fáceis para os predadores (MAGALHÃES et. al. 2000a)

Estudo sobre a esporulação, germinação e virulência são feitos com a finalidade de potencializar *M. anisopliae* var *acridum* para o controle biológico de acridídeos, neste sentido Magalhães et. al., 2000b avaliaram a esporulação de *M. anisopliae* var *acridum* e *B. bassiana* sobre cadáveres do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* sob condições de ambiente seco e úmido. Os fungos se apresentaram igualmente virulentos contra *R. schistocercoides*, sendo que *M. anisopliae* produziu internamente mais conídios do que *B. bassiana* em baixas umidades, externamente não houve esporulação quando os insetos foram incubados a 75% de umidade relativa e *M. anisopliae* var. *acridum* produziu significativamente mais conídios do que *B. bassiana* a 100% de umidade relativa, dados como esses são importantes para o conhecimento da epizootiologia das doenças, especialmente se os fungos forem utilizados em ambientes com baixa umidade relativa.

Arthus & Thomas (2001) conduziram estudos com a finalidade de avaliar os efeitos da temperatura e umidade relativa sobre a esporulação de *M. anisopliae* var. *acridum* em cadáveres de *S. gregaria*. A avaliação quantitativa da produção de conídios durante 10 dias, em condições controladas de laboratório revelou uma esporulação ótima, com umidade relativa em 96% e temperatura variando entre 20° C e 30° C. Esporulação relativamente baixa ocorreu a 15° C e nenhuma esporulação foi observada a 10 °C e 45 °C. A produção de conídios esteve intimamente associada com o conteúdo de água nos cadáveres dos gafanhotos. Quando submetidos às variações diárias de temperatura e umidade relativa, poucos conídios foram produzidos quando

comparados aos cadáveres que foram incubados nas condições favoráveis por um período cumulativo igual. Esses resultados mostraram que a esporulação foi um processo dinâmico dependente não apenas do período de exposição às umidades relativas favoráveis, mas também, associada à inter-relação com baixas umidades.

Blanford & Thomas (2001) demonstraram a patogenicidade através da sobrevivência, maturação e reprodução do gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria*, infectado com *M. anisopliae* var. *acridum*. Os estudos foram conduzidos com duas diferentes doses do fungo. Nos adultos infectados foi detectada uma alta e rápida mortalidade (>90%) após 10 dias. Os efeitos da infecção sobre a maturidade e a reprodução dependem da idade dos adultos na ocasião da inoculação. Os resultados dos experimentos mostraram também que *M. anisopliae* var. *acridum* é um potencial agente de controle dos gafanhotos nos diferentes estágios do ciclo biológico.

A termorregulação no gafanhoto *Locusta migratoria*, infectado com *M. anisopliae* var. *acridum* foi avaliada por Ouedraogo et al. (2003) e afetou negativamente o crescimento do fungo no inseto, embora os mecanismos responsáveis para esta supressão sejam complexos e permaneçam pouco entendidos. No processo de termorregulação, gafanhotos necessitam de temperaturas ótimas para a defesa imune, enquanto evitam temperaturas extremas que podem interferir com outros processos celulares básicos, dessa forma a temperatura do corpo pode inibir o crescimento do

fungo ajudando o inseto hospedeiro a vencer o processo infeccioso contra o patógeno.

Rangel et al. (2005) testaram a viabilidade na termotolerância de diferentes linhagens de *M. anisopliae*, de hospedeiros e regiões diferentes. Notável variabilidade na termotolerância foi encontrada entre os conídios de 16 linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, e de *M. anisopliae* var. *acridum*. As linhagens patogênicas a gafanhotos foram as que apresentaram alta germinação e foram mais tolerantes às radiações UV-B. Os estudos comprovaram que as temperaturas experimentadas em condições de campo podem ser um fator que favorecerá o controle biológico, quando da aplicação dos fungos no campo.

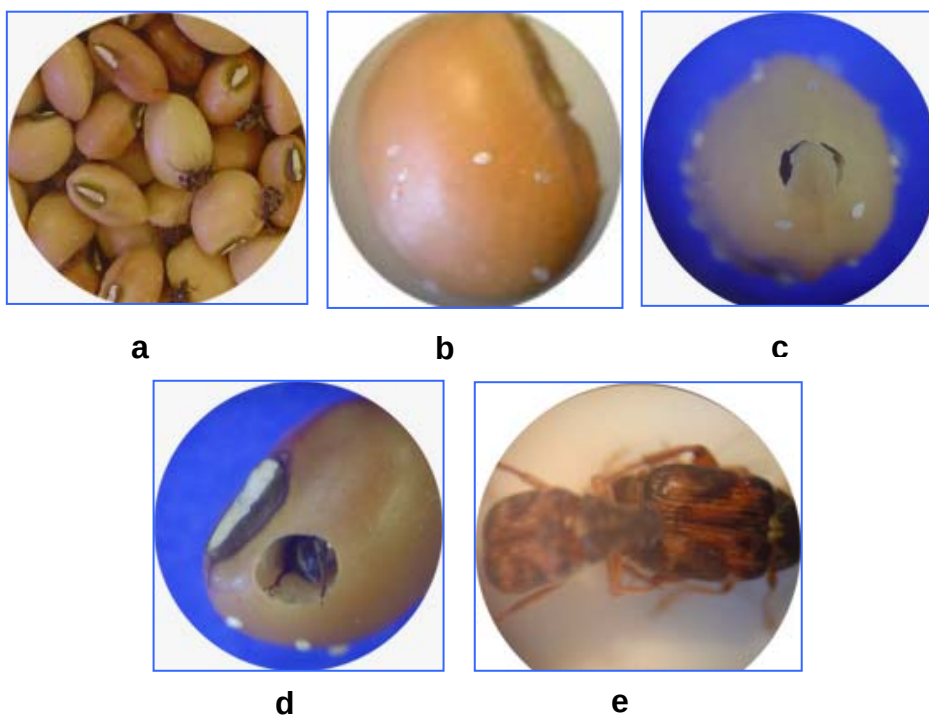
### **2.3. Aspectos biológicos e taxonômicos de *Callosobruchus maculatus***

*C. maculatus*, são besouros que medem aproximadamente 3 mm de comprimento, apresentando nos élitros manchas amarronzadas que em repouso formam um "X", vivem cerca de 5 a 8 dias, podendo eventualmente sobreviver até 12 dias. As fêmeas põem em média 80 ovos segundo Quintela et al. (1991) nas superfícies dos grãos. Ao eclodirem, as larvas penetram nos mesmos alimentando-se do conteúdo interno. Dentro dos grãos, transforma-se em pupas e, após a emergência, o adulto perfura um orifício de saída, e fora dos grãos, reiniciam o ciclo biológico (Figura 3 e 4).



**Figura 3.** Caruncho (*Callosobruchus maculatus*) na fase adulta.

Fonte Paz Jr, 2006



**Figura 4.** Ciclo biológico do *Callosobruchus maculatus*. a) fêmeas ovopositando sobre os feijões; b) feijão infestado com ovos; c) janela de emergência do adulto; d) inseto adulto saindo de dentro do feijão; e) acasalamento (à esquerda, macho).

Fonte Paz Jr, 2006.

O caruncho do feijão, devido ao seu potencial depreciativo e ocorrência mundial, é considerado a principal praga do feijão *Vigna unguiculata* armazenado, reduzindo o peso e a qualidade dos grãos, bem como o poder germinativo e qualidade das sementes (DONGRE et al., 1996). Este caruncho pode ocasionar perda de peso da ordem de 60% em sementes armazenadas (TANZUBIL, 1991), chegando a atingir, em seis meses de armazenamento, 90% de perdas em termos de sementes perfuradas (SECK et al., 1991).

#### **2.4. O controle biológico do *Callosobruchus maculatus***

O ataque de insetos em sementes armazenadas constitui um problema que se agrava cada vez mais devido, principalmente, ao desconhecimento dos produtores quanto à utilização e manuseio de substâncias químicas (FARONI et al., 1995). O controle químico na forma de fumigação tem sido uma prática corriqueira na desinfestação de grãos armazenados, mas devido à inobservância das práticas corretas, à aplicação de sub ou super dosagens e o desrespeito ao tempo mínimo de contato dos grãos com os inseticidas, têm produzido nos vários insetos-praga que infestam produtos armazenados o desenvolvimento de resistência genética aos princípios ativos dos produtos utilizados.

Esses fatos conduzem à necessidade de se estabelecer medidas de controle de pragas, por meio de métodos alternativos, sem desencadear os

problemas causados pelos inseticidas sintéticos químicos (FARONI et al., 1995).

Com a utilização de métodos alternativos procura-se encontrar técnicas que permitam reduzir o surgimento de resistência desenvolvida pelas pragas aos praguicidas organossintéticos, assim como estratégias que proporcionem uma opção de controle, que evitem a eliminação dos inimigos naturais, a contaminação da água, do ar e do solo, a intoxicação dos produtores e, especialmente, a acumulação de substâncias tóxicas nos produtos agrícolas alimentícios (CUNHA, 2002).

O controle biológico de pragas é uma das formas observadas pelos pesquisadores através dos anos, de controlar as populações de insetos no meio ambiente, limitando a sua multiplicação acelerada sem, no entanto causar danos a outros organismos geralmente benéficos que estão presentes no ambiente. O maior interesse na utilização do controle biológico esta na forma semelhante como a natureza age sem causar os prejuízos advindos da utilização dos produtos fitossanitários químicos. O uso de agentes entomopatogênicos apresenta vantagens em relação aos pesticidas químicos pela eficiência e baixos custos, pela segurança de uso demonstrada ao homem e demais organismos além da redução da utilização de resíduos tóxicos na agricultura e nos alimentos, auxiliando na preservação da saúde ambiental e da população de inimigos naturais presentes no ambiente (ALVES, 1992; FARIA et al., 2002; SANTOS Jr. et al., 2006).



A utilização de diferentes microrganismos para controle de pragas na forma de bioinseticidas e a utilização de plantas resistentes a insetos, pela produção de inibidor da enzima digestiva  $\alpha$ -amilase encontrada no trato digestivo de *C. maculatus*, esta em desenvolvimento e poderão num futuro próximo, contribuir para a redução do uso de inseticidas, minimizando assim, os impactos ambientais provocados pelos agrotóxicos. Porém, a liberação dessas plantas em escala comercial, requer diversas pesquisas a serem realizadas com o objetivo de avaliar os possíveis impactos que essa nova tecnologia possa causar ao meio ambiente e a saúde do homem e dos animais (MARSARO Jr., 2005).

As técnicas biológicas desenvolvidas consistem na introdução de inimigos naturais, incluindo predadores, protozoários, fungos, bactérias, vírus e em alguns casos substâncias produzidas pelo próprio inseto, as quais apresenta excelente perspectiva de utilização. Esses agentes de controle podem ser manipulados para o aumento da patogenicidade, ampliação do espectro de ação, produção industrial ou a incorporação de genes a inseticidas em espécies vegetais (AZEVEDO & MESSIAS, 1985; ALVES, et al., 2002; SILVA et al., 2004).

## **2.5. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos em associação com inseticidas químicos**

A utilização de produtos químicos no controle de pragas e doenças do feijoeiro é realizada através de varias pulverizações que elevam consideravelmente o custo da produção, e muitas vezes o controle das pragas obtém apenas sucesso limitado (VIEIRA, 1988). O uso indiscriminado desses produtos deixa resíduos de elevada toxicidade nos produtos vegetais (KOVALESKI & RIBEIRO, 2003), causando vários problemas, como a resistência aos inseticidas, o surgimento de pragas secundárias, a ausência de inimigos naturais, o risco de contaminação por agrotóxicos para a saúde humana, a contaminação do solo e das nascentes além da diminuição da biodiversidade (ALVES et al., 1998; MELO & AZEVEDO, 2000; AZEVEDO, 2001; LACEY et al., 2001; MARQUES et al., 2004).

Em função dos avanços das pesquisas e de uma conscientização maior dos problemas advindos com o uso intensivo de inseticidas (NORA & HICKEL, 1997) e o elevado custo desses defensivos agrícolas, o controle biológico com fungos entomopatogênicos surge como alternativa para a redução da densidade populacional de pragas agrícolas. (KAAYA, 1989; TEFERA & PRINGLE, 2003).

A susceptibilidade dos fungos entomopatogênicos aos produtos fitossanitários pode variar de acordo com a natureza química dos defensivos e

as dosagens empregadas. Assim, existem produtos que podem ser letais para alguns patógenos, outros que possuem apenas efeito fungistático e um outro grupo que pode até melhorar o crescimento vegetativo, a reprodução e a virulência dos fungos entomopatogênicos. Dessa maneira, torna-se muito importante o conhecimento da ação desses produtos químicos sobre o desenvolvimento dos entomopatógenos (ALVES & LECUONA, 1996). Vários estudos têm demonstrado alterações no desenvolvimento de *M. anisopliae*, sendo necessária a precaução quando utilizado no Manejo Integrado de Pragas (MIP) e doenças, caso exista o uso conjunto com este fungo (ALVES et al., 1998; HIROSE et al., 2001; NEVES et al., 2001; LOUREIRO et al., 2002; BARRETO et al., 2004). Portanto a utilização dos defensivos seletivos tende a preservar os microrganismos, maximizando seus efeitos nos diferentes agroecossistemas.

A utilização de inseticidas em associação com fungos pode afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese desses entomopatógenos, acarretando modificações na sua virulência (MALO 1993; ALVES et al., 1998; NEVES et al., 2001; LOUREIRO et al., 2002). Por outro lado o uso de inseticidas selecionados, como estratégia no MIP, associados aos agentes entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle, diminuindo a quantidade de defensivos agrícolas, minimizando os riscos de contaminação e o surgimento de genes de resistência (MOINO Jr & ALVES, 1998; QUINTELA & McCOY, 1998).

A interação entre produtos químicos e biológicos, ou seja, o controle associado (utilização do controle químico simultaneamente com o agente microbiano), deve receber atenção especial em culturas nas quais o uso do controle químico é indispensável (ALVES et al., 1998). Vários estudos foram feitos para se conhecer a ação dos produtos químicos sobre os fungos entomopatógenos para determinar sua compatibilidade com esses produtos (BATISTA FILHO et al., 2001; DAL BELLO et al., 2001; NEVES et al., 2001; MOURÃO et al., 2003, ANDALÓ et al., 2004).

O controle de pragas na agricultura é um dos fatores que influem no aumento do custo de produção, gerando problemas para o produtor, o consumidor e o meio ambiente. Os inseticidas são responsáveis por consideráveis valores no mercado mundial de defensivos agrícolas, que chegam a aproximadamente US\$ 2,0 bilhões, sendo que os bioinseticidas participam apenas com 1% deste total (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2001).

Um fator que pode interferir no sucesso do controle microbiano é a compatibilidade apresentada por alguns inseticidas químicos quando em ação conjunta com fungos entomopatogênicos. Geralmente estas aplicações combinam doses subletais de pesticidas, as quais podem atuar de maneira positiva em combinação com os entomopatógenos, interagindo com estes, causando ou ativando doenças infecciosas por estresse, ou tornando os insetos mais susceptíveis à ação das toxinas microbianas (BATISTA FILHO et al., 2001).

Vários estudos foram realizados testando a compatibilidade de fungos entomopatógenos em relação aos inseticidas, herbicidas e outros produtos químicos empregados na agricultura. Estudos de compatibilidade são, em geral, desenvolvidos em laboratório, onde é realizada a exposição dos fungos entomopatógenos ou culturas dos mesmos a concentrações conhecidas dos diversos produtos a serem testados (PEREIRA et al., 1998). A maioria desses estudos visam principalmente o aspecto relativo ao desenvolvimento fúngico, como crescimento micelial, esporulação e germinação conidial. Muitos pesquisadores relatam que fungos entomopatogênicos são diferentemente afetados por muitos fungicidas e alguns inseticidas. Os principais produtos químicos utilizados na agricultura que inibem o crescimento dos fungos em testes de laboratório incluem: Benomil, Zineb, Captan, Paratiom metílico e Fentoato. Benomil foi descrito como o mais inibitório de todos os pesticidas avaliados contra vários fungos (MOHAMED et al., 1987), como *Nomuraea rileyi*, ao reduzirem a germinação e provocar atraso de 2 a 14 dias na iniciação da epizootia deste fungo (SOSA-GÓMEZ et al., 2003).

Loureiro et al., (2002), ao estudarem os produtos Pirimicarbe, Óxido cuproso, Iprodione 1, Ciromazina, Abamectina, Formetanato, Iprodione 2, Fenpropatrina e Folpete relataram a ocorrência de modificações morfológicas sensíveis nas colônias de *M. anisopliae* quando comparadas as colônias não tratadas com os mesmos produtos, e observaram as seguintes modificações: presença de bordas irregulares, crescimento vertical, mudança na coloração dos conídios e regiões circulares com micélio cottonoso, além da

redução na produção de conídios. Também relataram que os produtos Tiofanato metílico, Cartape, Paratiom metílico, Tebuconazole, Tetraconazole, Metalaxil e Mancozebe impediram a produção de conídios e o crescimento das colônias. Entretanto, estudos demonstram a possibilidade de associação de alguns produtos a fungos entomopatogênicos, como Chlorpyrifos, Cyfluthrin e Propetamphos (PACHAMUTHU & KAMBLE, 2000), Carbendazim, Kresoxymetil e Nuarimol (LATTEUR & JANSEN, 2002), Methomyl (MANIANIA et al., 2002), Ácido bórico (ZUREK, 2002), Endosulfan (MOURÃO et al., 2003), Imidaclopride, Fipronil e Tiametoxam (NEVES & ALVES, 1999; BATISTA FILHO et al, 2001; FURLONG & GRODEN, 2001; LOUREIRO et al., 2002).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A. C.; PEREIRA, K. C. A.; CUNHA, F. M.; VEIGA, A. F. S. L.; ATHÁIDE, A. C. R.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoenses* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.585-591, 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. New York, John Wiley & Sons, Inc. 4ª Edição, 1996,. 869p.

ALMEIDA, J. E. M. & BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.21, p.30-33, 2001.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: S. B. ALVES (ed.). **Controle Microbiano de insetos**. São Paulo, FEALQ, p.289-381. 1998. 1163p.

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

ALVES, S. B. & LECUONA, R. E. Utilización de hongos entomopatógenos. In: R. E. LECUONA. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Ayres, Edição do Autor, p.241-252. 1996. 300p.

ALVES, S. B.; MOINO Jr., A. ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: S. B. ALVES. (ed.). **Controle Microbiano de insetos**. São Paulo, FEALQ, p.217-238. 1998. 1163p.

ALVES, S. B.; ROSSI, L. S.; LOPES, R. B.; TAMAI, M. A.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acaro: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.8, p.70-77, 2002.

AMIRI-BESHELI, B.; KHAMBAY, B.; CAMERON, S.; DEADMAN, M. L.; BUTT, T. M., Inter and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium spp.*, and its significance to pathogenesis. **Mycological Research**, v.104, p.447–452, 2000.

ANDALÓ, V.; MOINO Jr., A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, v.33, p.463-467, 2004.



ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHOS, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. 2005. Cultivo de feijão-caupi. Embrapa Meio Norte, Teresina. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm>>.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, v.31, p. 172-180, 2004.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; RECH E. L. Feijão transgênico – um produto da engenharia genética. **Biotecnologia, Biologia e Desenvolvimento**, v.1, p.1-5, 1998.

ARTHUS, S. & THOMAS, M. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.59-65, 2001.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para o controle de carrapato bovino *Boophilus microplus*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.21, p.12-15, 2001.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In: C. S. MELO, & J. L. AZEVEDO. (Org.) **Controle Biológico**. Jaguariúna – SP EMBRAPA, p.69-96. 1998.

AZEVEDO, J. L. & MESIAS, C. L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: J. L. AZEVEDO. (Org.) **Genética de Microorganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracicaba, FEALQ USP, p.111-114. 1985.

AZEVEDO, J. L. O uso de fungos na biotecnologia. In: L. A. SERAFIN; N. M. BARROS, M.; J. L. AZEVEDO. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda. p.297-317. 2001.

BARRETO, R. S.; MARQUES, E. J.; GONDIM Jr, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the control of the mite *Mononychellus tanajoa* (BONDAR). **Scientia Agricola**, v.61, p.659-664, 2004.

BATISTA FILHO, A., J.; ALMEIDA E. M.; LAMAS. C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical entomology**, v.30, p.437-447, 2001.

BATTA, Y. A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina:Hyphomycetes). **Crop Protection**, v.22, p.415-422, 2003.

BLANFORD, S. & THOMAS, M. B. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.1-8, 2001.

BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; BALL, B. V.; CLARK, S. J. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. **Biocontrol Science Technology**, v.4, p.207–214, 1994.

CHERRY, A. J.; ABALO, P.; HELL, K. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. **Journal of Stored Products Research**. v.41, p.295-309, 2005.

CRUZ, I. Controle biológico em manejo integrado de pragas. In: J. R. PARRA; P. S. M. BOTELHO, B. S. CORRÊA-FERREIRA, J. M. S. BENTO (eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 543-570. 2002. 635p.

CUNHA, E. M. **Efeito de produtos vegetais e da fosfina no controle do *Callosobruchus maculatus* e na qualidade fisiológica de sementes de caupi (*Vigna unguiculata*).** 2002. 37 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba.

DAL BELLO, G.; PADIN, S.; LASTRA, C. L.; FABRIZIO, M. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.77-84, 2001.

DIAS, J. M. P.; PIRES, C. S. S.; MAGALHÃES, B. P.; FONTES, E. M. G. Distribuição regional, força de trabalho e atividades principais dos laboratórios que trabalham em controle biológico de insetos no Brasil. In. **Control Biologico no el Cone Sur**. Pelotas, EMBRAPA – CPACT, p.111-137. 1994. 175p.

DONGRE, T. K.; PAWAR, S. E.; THAKARE, R. O.; HARWALKAR, M. R. Identification of resistant sources to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)) in *Vigna* sp. and inheritance of their resistance in black gram (*Vigna mungo* var. *mungo*). **Journal of Stored Products Research**, v.32, p.201-204, 1996.

DRIVER, F.; MILNER, R. F.; TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v.104, p.134-150, 2000.

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

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P.; ALVES, R. T.; SCHMIDT, F. G. V.; SILVA, J. B. T.; FRAZÃO, H. E. A. Effect of two dosagens of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* against *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1531-1539, 2002.

FARONI, L. R. A.; MOLIN, L.; ANDRADE, E. T.; CARDOSO, E. G. Utilização de produtos naturais no controle de *Acanthoselides obtectus* em feijão armazenado. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.20, p.44-48, 1995.

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

FURLONG, M. J. & GRODEN, E. Evaluation of synergistic interactions between the colorado potato beetle (Coleoptera) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. **Journal of Economic Entomology**, v.94, p.344-356, 2001.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E. J.; VILAS BOAS, A. M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal.) no Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico da Codecap**. N.3 (11) 56p. 1974.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J. A. C.; MARTINS, L. H.; PERALTA, C. H.; MOINO Jr., A. A effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.419-423, 2001.

KAAYA, G. P. *Glossinia morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenics fungi. **Acta Tropical**, v.46, p.107-114, 1989.

KENDRICK, W. B. **Taxonomy of Fungi Imperfect**. Toronto: University of Toronto Press, 1971. 390p.

KENDRICK, W. B. **The Fifth Kingdom**. Canadá: Mycologue Publications, 1992. 406p.

KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, p.213-223, 1999.

KOVALESKI, A. & RIBEIRO, L. G. Manejo de pragas na produção integrada de maçãs. In: PROTAS, J. F. S. & SANHUEZA, R. M. V. **Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. v.34, p.61-76, 2003. (Circular Técnica).

LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. K.; VAILS, P. Insects pathogens as biological control agents: do they have a future? **Biological Control**, v.21, p.230-248, 2001.

LATTEUR, G. & JANSEN, J. P. Effects of 20 fungicides on the infectivity of conidia of the aphid entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis*. **BioControl**, v.47, p.435–444, 2002.

LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.178-182. 2001.

LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIDGE, M.; PARKER, B. L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera:Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.139-147, 2003.

LOUREIRO, E. S.; MOINO Jr., A.; Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* (Glover) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.660-665, 2006.

LOUREIRO, E. S.; MOINO Jr., A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G. C. Efeitos de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v.31, p.263-269, 2002.

LOUREIRO, E. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsc.) Sorokin contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.34, p.791-798, 2005.

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



LUNA-ALVES LIMA, E. A. & TIGANO, M. S. Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. **Revista de Microbiologia**, v.20, p.85-94, 1989.

MAGALHÃES, B. P.; FARIAS, M. R.; SILVA, J. B. T. Controle microbiano de gafanhoto. In: I. S. MELO & J. L. AZEVEDO. (Ed.) **Controle Biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA Meio Ambiente, p.173-212. 387p. 2000a.

MAGALHÃES, B. P.; GOETTEL, M. S.; FRAZÃO, H. S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31. p.161-163. 2000b.

MALO, A. R. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. **Revista Colombiana Entomológica**, v.19, p.151-158, 1993.

MANIANIA, N. K.; EKESI, S.; LÖHR, B.; MWANGI, F. Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. **Mycopathologia**, v.155, p.229-235, 2002.

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.

MARQUES, R. P.; VILAS-BOAS, A. M.; PEREIRA, C. E. F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em laboratórios setoriais. **PLANALSUCAR. Boletim Técnico**, v.3, p.5-23, 1981.

MARSARO JÚNIOR, A. L. Controle de pragas pode ser feito com inibidores de enzimas digestivas. Disponível em: <  
[http://www.embrapa.gov.br/noticias/artigos/folder.2005-02-02.1550581232/artigo.2005-09-15.5150977748/mostra\\_artigo](http://www.embrapa.gov.br/noticias/artigos/folder.2005-02-02.1550581232/artigo.2005-09-15.5150977748/mostra_artigo)>

MAVRIDOU, A.; CANNONE, J.; TYPAS, M. A. Identification of group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Fungal Genetic and Biology**, v.31, p.79-90, 2000.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna, São Paulo: EMBRAPA Meio Ambiente, 388p. 2000.

MICHALAKI, M. P.; ATHANASSIOU, C. G.; KAVALLIERATOS, N. G.; BATT, Y. A.; BALOTIS, G. N. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Du Val larvae: Influence of temperature, relative humidity and type of commodity. **Crop Protection**, v.25, p.418-425, 2006.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; DE BARTOLI, S. A.; DÓRIA, H. O. S. BARBOSA, J. C.; Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Weid.) (Díptera: Tephritidae) in Soil with Different Pesticides. **Biological Control**, v.35, p.382-389, 2006.

MOHAMED, A.K.A.; PRATT, J.P. & NELSON, F.R.S. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with chemical pesticides. **Mycopathologia**, v.99, p.99-105, 1987.

MOINO Jr, A. & ALVES, S. B. Efeito de idacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.27, p.611-619, 1998.

MOREIRA, M; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES, M. C. C.; CHAGAS, M. C. M.; Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozspal (Hyphomycetes) on *Shistocerca pallens* (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.58, p.613-616, 1996.

MOURÃO, S. A.; VILELA, E. F.; ZANUNCIO, J. C.; ZAMBOLIM, L. O.; TUELHER, E. S. Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Neotropical Entomology**, v.32, p.103-106, 2003.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.80–88, 2004.

NEVES, P. J. & ALVES, S. B. Controle associado de *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidacloprid. **Scientia agricola**, v.56, p.301-311, 1999.

NEVES, P.J. & ALVES, S.B. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. Strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.373-378, 2000.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P. T.; MOINO Jr., A. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. **Neotropical Entomology**, v.30, p.263-268, 2001.

NORA, I.; HICKEL, E. R. **Controle integrado de moscas-das-frutas – manual do produtor**. Florianópolis, SC: EPAGRI, 21p. 1997 (Boletim Didático).

OUEDRAOGO, R.M.; CUSSON, M.; GOETTEL, M.S.; BRODEUR, J. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.103-109, 2003.

PACHAMUTHU, P. & KAMBLE, S.T. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.93, p.60-70, 2000.

PANTOU, M. P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetic and Biology**, v.38, p.159-174, 2003.

PAZ Jr., F. B. da **Ação Patogênica de Linhagens de *Beuaveria bassiana* ao *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae), Análise Genética (PCR) e Compatibilidade Química**. Tese, Doutorado em Biologia de Fungos. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 95p., 2006.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas. In: ALVES S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: ESALQ/USP, p.1097-1118, 1998.

QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIRÓS, R.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, p.51-58, 2004.

QUINTELA, E. D.; NEVES, B. P. das; QUINDERÉ, M. A. W.; ROBERTS, D. W. Principales plagas del caupi en el Brasil. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1991. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 35).

QUINTELA, E. D. & McCOY C. W. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera:Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. **Biological Control**, v.26, p.1173-1182, 1997.

QUINTELA, E. D. & McCOY C. W. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera:Curculionidae) treated with imidacloprid. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.72, p.220-230, 1998.

QUINTELA, E. D. & FERREIRA, E. Cultivo do feijoeiro comum. Embrapa Arroz e Feijão – uso de agrotóxicos. Disponível em [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivo do Feijoeiro / agrotóxicos.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivo_do_Feijoeiro/agrotóxicos.htm) . 2006.

RAKOTONIRAINY, M. S.; CRIOU, M. L.; BRYGOO, Y.; RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. **Mycological Research**, v.98, p.225-230, 1994.

RANGEL D. E. N.; BRAGA G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON A. J.; ROBERTS D. W., Variations in UV-B radiation tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.87, p.77-83, 2004.

RANGEL D. E. N.; BRAGA G. U. L.; ANDERSON A. J.; ROBERTS D. W., Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.90, p.55–58, 2005.

RIBEIRO, S. M. A.; LUNA-ALVES LIMA, E. A.; ASSUNÇÃO, W. T. G.; LIMA, D. M. M. Behavior and characteristics of a wild strain of *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.23, p.97-100, 1992.

SAMUELS, R. I.; CORACINI, D. L. A.; MARTINS DOS SANTOS, C. A.; GAVA, A. T. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera:Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beuaveria bassiana*. **Biological Control**, v.23, p.269-273, 2002.

SANTOS JR., H. G.; MARQUES, E. J.; BARROS. R.; GONDIM Jr., M. G. C. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Lothidae) sobre larvas das traças das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepdoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.241-245, 2006.

SCHOLTE E. J.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity **Journal of Invertebrate Pathology**, v.91, p.43–49, 2006.

SECK, D.; SIDIBÉ, R.; HAUBRUGE, E.; HEMPTINNE, L.; GASPAR, C. La protection chimique des stocks de niébé et de maïs contre les insectes au Sénégal. Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen **Rijksuniversiteit Gen**, [S.I.], p.1225-1234, 1991.



SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.

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

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

SOSA-GÓMEZ, D. R.; DELPIN, K. E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M. H. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. **Neotropical Entomology**, v.32, p.287-291, 2003.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETEEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS D. W. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v.13, p.274-288, 1989.

ST. LEGER, R. J.; GOETEEL, M. S.; ROBERTS D. W.; STAPLES, R. C.;  
Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*.

**Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.168-179, 1991.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsin produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1257-1264, 1996.

STONEL, L. F. & SARTORATO, A. **O cultivo do feijão: recomendações técnicas**. Goiânia, GO: EMBRAPA/CNPAP (Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária do Arroz e do Feijão), 28p. 1994.

SUN, J.; FUXA, J. R.; HENDERSON, G. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.81 p.78-85. 2002.

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.

TANZUBIL, P. B. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, v.37, p.216-217, 1991

TEFERA, T.; PRINGLE, K. L. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera:Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.84, p.220-225, 2003.

TOMÉ, P. H. F.; GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; CABRAL, L. C.; SANTOS, D. S. Controle de *Zabrotes subfasciatus* B. (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) em todas as fases do desenvolvimento pela atmosfera controlada com CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, em feijão. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.26, p.3-9, 2001.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.66, p.407-411, 1976.

VESTERGAARD, S.; GILLESPIE, A. T.; BUTT, T. M.; SCHREITER, G.; EILENBERG, J. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Biocontrol Science Technology**, v.5, p.185–192. 1995.

VEY, A.; HOAGLAND, R.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: T. M. BUTT; C. W. JACKSON; N. MAGAN. (Eds.), **Fungi as Biocontrol Agents**. CAB International, Wallingford, UK, p.311–345. 2001.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: imprensa Universitária, UFV, 231p. 1988.

WANG, C.; SKROBEK, A.; BUTT, T. M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.168–174, 2004.

ZUREK, L.; WATSON, D.W.; SCHAL, C. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). **Biological Control**, v.23, p.296–302, 2002.

#### 4. CAPÍTULOS

## CAPÍTULO I

**Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metsch.) Sorokin com Inseticidas Químicos Utilizados para o Controle do *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae).**

Manuscrito a ser enviado para publicação na Revista

**NEOTROPICAL ENTOMOLOGY**

Carlos Fernando Rodrigues Guaraná

Área de Ecologia, Departamento de Biologia,

Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE,

Rua Dom Manuel de Medeiros S/N, Dois Irmãos,

CEP 52171-900, Recife, PE.

[guarana@db.ufrpe.br](mailto:guarana@db.ufrpe.br)

Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metsch.) Sorokin com Inseticidas  
Químicos Utilizados para o Controle do *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)  
(Coleoptera: Bruchidae).

Carlos F. R Guaraná.<sup>1</sup>; Francisco B. da Paz Jr.<sup>2</sup>; Auristela C. Albuquerque<sup>1</sup>;  
Venézio F Santos<sup>3</sup>; Elza A. Luna-Alves Lima<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco / UFRPE, Departamento de Biologia, Área de Ecologia, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE. Brasil. [www.ufrpe.br](http://www.ufrpe.br), [guarana@db.ufrpe.br](mailto:guarana@db.ufrpe.br), [auritermes@yahoo.com.br](mailto:auritermes@yahoo.com.br).

<sup>2</sup>CEFETPE UNED Pesqueira Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE, CEP 55200-000 PE, Brasil. [www.cefetpesqueira.edu.br](http://www.cefetpesqueira.edu.br), [fbpjuniior@cefetpesqueira.edu.br](mailto:fbpjuniior@cefetpesqueira.edu.br)

<sup>3</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco – IPA, Pernambuco, Brasil. [www.ipa.br](http://www.ipa.br), [venezio@ipa.br](mailto:venezio@ipa.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco / UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Avenida Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE. Brasil. [www.ufpe.br](http://www.ufpe.br), [ealal@bol.com.br](mailto:ealal@bol.com.br)

Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin and  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metsch.) Sorokin with Chemical  
Insecticides Utilized for the Control to *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)  
(Coleoptera: Bruchidae).

#### ABSTRACT

The fungitoxic effect, *in vitro*, of five insecticides, Imidaclopride (Confidor 700 GR), Deltametrina (Decis 25 SC and K-Othrine CE 25), Carbaril (Sevin 480 SC) and azadiractina (Chemioil) in the concentrations recommended by the manufacturer was evaluated on the *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412. The effect on the vegetative growth, the germination and the sporulation of the conidia was also evaluated. Considering the interaction among the insecticides, independently of tested strains, Confidor had a synergic effect, evidenced by the greatest growth of the colony, while Chemioil and Sevin showed greater inhibitory effect on the growth of mycelia from the strains, differing significantly from the control. In *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, the vegetative growth was lower than the control with Decis, Chemioil and Sevin, and higher with Confidor and K-Othrine. Considering the germination of conidia, only Decis reduced the germination significantly. The conidia production was inhibited in all of treatments, with greatest effect when associated with Chemioil. Considering *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412, the statistical analysis did not show significant variation in the percentile of germination in all applied treatments, in spite of different values. The results showed that the insecticides did not affect the germination of conidia; however they affected the vegetative growth. In relation to the conidia number, Sevin and Chemioil were the chemical products that promoted the largest percentile of reduction 81.25 and 75.01%, respectively, in relation to the control. The insecticides tested in the selected concentrations, excepting Chemioil, were compatible with tested mushrooms. Therefore, those products can be recommended in programs of integrated pest management (IPM) programmes for the pest control with entomopathogens as natural enemies.



KEY WORDS: Entomopathogenic fungi, Biological Control, Insecticides, *Vigna unguiculata*, Cowpea.

## RESUMO

O efeito fungitóxico, *in vitro*, de cinco inseticidas comerciais, Confidor 700 GR (Imidaclopride), Decis 25 SC e K-Othrine CE 25 (ambos Deltametrina), Sevin 480 SC (Carbaril) e Quimióleo (Azadiractina) nas concentrações recomendadas pelo fabricante, foi avaliado sobre *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412. O efeito sobre o crescimento vegetativo, germinação e esporulação dos conídios foi avaliado. Quanto à interação dos inseticidas, independentemente da linhagem testada, Confidor teve efeito sinérgico, evidenciado pelo maior crescimento da colônia, enquanto Quimióleo e Sevin apresentaram maior efeito inibitório sobre o crescimento micelial, diferindo significativamente do controle. Para *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, o crescimento vegetativo foi inferior ao do controle com Decis, Quimióleo e Sevin, e superior com Confidor e K-Othrine. Quanto à germinação dos conídios, apenas Decis reduziu significativamente a germinação. A produção de conídios foi inibida em todos os tratamentos, com o maior efeito apresentado na associação com Quimióleo. Para *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412, A análise estatística não mostrou variação significativa nos percentuais de germinação nos tratamentos aplicados, embora tenham apresentado diferentes valores. Os resultados mostraram que os inseticidas não afetaram a germinação conidial, entretanto afetaram o crescimento vegetativo. Em relação ao número de conídios, Sevin e Quimióleo foram os produtos químicos que promoveram os maiores percentuais de redução 81,25 e 75,01% nesta ordem em relação ao controle. Os inseticidas testados nas concentrações utilizadas, com exceção de Quimióleo, foram compatíveis com os fungos testados. Portanto, esses produtos poderão ser recomendados em programas de Manejo Integrado de Pragas para o controle de pragas que tenham esses entomopatógenos como inimigos naturais.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos entomopatogênico, Controle Biológico, Inseticidas, *Vigna unguiculata*, Caupi.

A área ocupada por caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.), no mundo, está em torno de 12,5 milhões de hectares, sendo 4,5 milhões localizados no continente americano e asiático. Dentre os principais produtores mundiais deste feijão, destaca-se o Brasil com uma produção anual na ordem de dois milhões de toneladas, o que equivale à cerca de 20% da produção mundial (Andrade Júnior *et al.* 2005). O caupi constitui-se um dos principais componentes da dieta alimentar das regiões Nordeste e Norte do nosso País, sendo cultivado principalmente por pequenos e médios agricultores, devido a sua importância como cultura de subsistência (Moraes & Ramalho 1980, Tomé *et al.* 2001).

O emprego de produtos químicos no controle de doenças do feijoeiro implica em múltiplas pulverizações que elevam substancialmente o custo da produção. Além disso, os resultados, às vezes, indicam apenas sucesso limitado. O uso indiscriminado desses produtos deixa resíduos de elevada toxicidade, gerando vários problemas, inclusive a resistência aos inseticidas, o surgimento de pragas secundárias que inibem os inimigos naturais, o aumento de riscos para a saúde humana, a contaminação de nascentes e a diminuição da biodiversidade (Alves *et al.* 1998, Melo & Azevedo 2000, Azevedo 2001, Lacey *et al.* 2001, Marques *et al.* 2004).

Em função dos avanços das pesquisas e de uma conscientização maior dos problemas advindos com o uso intensivo de inseticidas e o elevado custo desses defensivos agrícolas, o controle microbiano utilizando por fungos entomopatogênicos surge como alternativa viável à redução da densidade populacional de pragas agrícolas. (Kaaya Tefera & Pringle 2003). Dentre os fungos entomopatogênicos, destaca-se *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)

Sorokin, visto o sucesso alcançado como controlador de insetos pragas, tais como *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Moreira *et al.* 1996), *Heterotermes tenuis* (Hagen). (Moino Júnior & Alves 1998), *Castnia licus* (Drury) (Figueiredo *et al.*, 2002), *Blatella germanica* (L.) (Quesada-Moraga *et al.* 2004), *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Albuquerque *et al.* 2005), entre outros.

A susceptibilidade dos fungos entomopatogênicos aos produtos fitossanitários pode variar de acordo com a natureza química dos defensivos e as dosagens empregadas. Assim, existem produtos que podem ser letais para alguns patógenos, outros que possuem apenas efeito fungistático e um outro grupo que pode até melhorar o crescimento vegetativo, a reprodução e a virulência dos fungos entomopatogênicos. Dessa maneira, torna-se importante o conhecimento da ação desses produtos químicos sobre o desenvolvimento dos agentes entomopatogênicos (Alves & Lecuona 1998). Vários estudos têm demonstrado alterações no desenvolvimento de *M. anisopliae*, sendo necessária precaução quando utilizado no Manejo Integrado de Pragas e doenças, caso exista o uso conjunto de inseticidas com este fungo (Alves *et al.* 1998; Hirose *et al.* 2001, Neves *et al.* 2001, Loureiro *et al.* 2002, Barreto *et al.*, 2004). Portanto a utilização dos defensivos seletivos tende a preservar os microrganismos, maximizando seus efeitos nos diferentes agroecossistemas.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito fungitóxico dos produtos fitossanitários utilizados nas culturas de caupi sobre *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* e selecionar o fungo e os inseticidas mais compatíveis para o emprego no controle de *Callosobruchus maculatus*.

## Material e Métodos

**Linhagens fúngicas utilizadas.** *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* PL<sub>43</sub> isolada originariamente de *Mahanarva posticata* (Stal.), em Alagoas e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* CG<sub>291</sub> isolada originariamente de *Austracnis guttulosa* (Walker), Austrália. Os isolados estão depositados na Coleção de Culturas Micoteca-URM do Departamento de Micologia, CCB, UFPE sob os seguintes números de acessos *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412.

**Inseticidas utilizados.** O efeito de produtos fitossanitários químicos sobre os fungos foi estudado avaliando-se o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos entomopatógenos na presença ou ausência dos inseticidas. Os quais foram adicionados a Batata Dextrose-Ágar (BDA) da Oxoid, - ainda líquido ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ), nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para aplicações em campo (Tabela 1).

**Mensuração do crescimento micelial.** Foram preparadas sete placas de Petri (BDA + inseticidas) por tratamento, sendo colocado, no centro da placas, disco de inóculos de  $9\text{mm}^2$  com o auxílio de alça de platina. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), fotofase de 12 horas,  $75\pm 5\%$  UR durante 12 dias. Posteriormente foi realizada a mensuração, a cada 72 horas, das colônias, com o auxílio de uma régua milimetrada, até o décimo segundo dia após a inoculação. O crescimento vegetativo foi determinado medindo-se os diâmetros da colônia, considerando o diâmetro médio de cada colônia.

**Tabela 1.** Inseticidas químicos, registrados para a cultura do caupi, utilizados nos testes de compatibilidade com *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412.

| Nome            |               | Grupo químico              | P.C <sup>a</sup> | C. T <sup>b</sup> |
|-----------------|---------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| Comercial       | Técnico       |                            |                  |                   |
| Confidor 700 GR | Imidaclopride | Neonicotinóide             | 150g/ ha         | 4                 |
| Decis 25 SC     | Deltametrina  | Piretróide                 | 30mL/100L        | 3                 |
| K-Othrine CE 25 | Deltametrina  | Piretróide                 | 6mL/1L           | 3                 |
| Quimióleo       | Azadiractina  | -                          | 2L/100L          | 4                 |
| Sevin 480 SC    | Carbaril      | Metilcarbamato de Naftila. | 225 mL/100 L     | 3                 |

<sup>a</sup>Dose do produto comercial; <sup>b</sup> Classificação toxicológica: 3 – Medianamente Tóxico; 4 - Pouco Tóxico.

**Produção de conídios e análise de germinação.** Com auxílio de um bisturi inóculo de cada colônia foi transferido para tubos de ensaio contendo 10mL de solução Tween 80 a 0,05%. A suspensão foi agitada por aproximadamente dois minutos em Vortex e, em seguida, quantificada em câmara de Neübauer utilizando o campo de contagem 4, de acordo com Alves & Moraes (1998). Da suspensão final, 0,1 mL foi espalhado com o auxílio da alça de Drigalsky por toda a superfície da placa de Petri contendo BDA. O percentual de germinação dos conídios foi determinado contando-se 500 conídios por placa a partir das 16 horas após a semeadura e os valores submetidos à fórmula de Alves & Pereira (1998), onde  $G\% = n \times 100/500$ , **G %** é o percentual de germinação e **n** o número de conídios germinados.

**Toxicidade dos produtos químicos.** Para se avaliar a toxicidade dos produtos químicos sobre as linhagens foi utilizado o modelo proposto por Alves *et al.* (1998) que permitiu a separação dos produtos em classes de seletividade/compatibilidade:  $T = 20(CV) + 80(ESP) / 100$ , onde T é o valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para a classificação do produto químico; CV é o percentual de crescimento vegetativo com relação à testemunha e ESP é o percentual de esporulação com relação à testemunha. Os valores para a classificação dos efeitos dos produtos químicos sobre os fungos foram: 0 a 30 (muito tóxico), 31 a 45 (tóxico), 46 a 60 (moderadamente tóxico) e acima de 60 (compatível).

**Análise estatística.** O delineamento foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 2 x 6 (duas linhagens e seis tratamentos) com sete repetições, sendo os dados submetidos à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade. A compatibilidade química das linhagens fúngicas com os inseticidas foi analisada pelo teste F da ANOVA do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) versão 5.0 (Euclides 1985).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

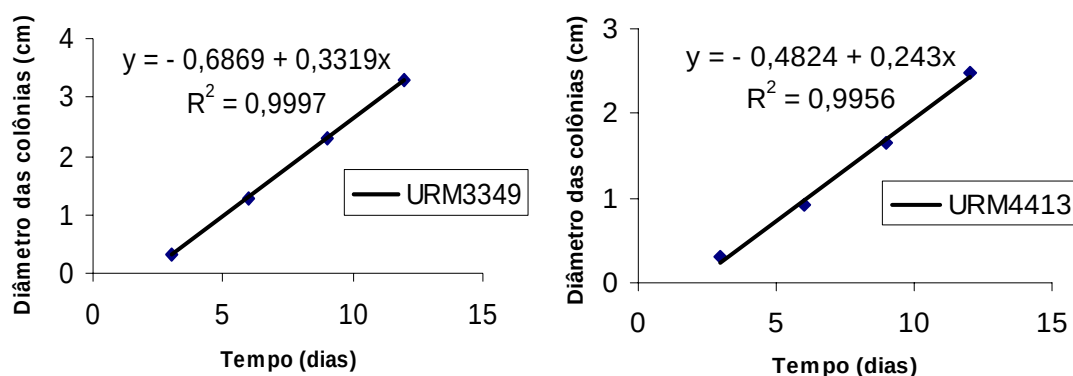
A análise de variância mostrou interação significativa entre as linhagens e os inseticidas no decorrer do experimento. Os valores médios do crescimento micelial das linhagens testadas diferiram significativamente entre si. *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior média e taxa de crescimento nos intervalos de tempo estudados (Tabela 2, Figura 1).

**Tabela 2.** Comparação dos valores médios do crescimento micelial das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 e tratamentos em intervalos de tempo

| Linhagens          | Tempo (dias) |       |                   |                   | Média |
|--------------------|--------------|-------|-------------------|-------------------|-------|
|                    | 3°           | 6°    | 9°                | 12°               |       |
| URM3349            | 0,33a        | 1,27a | 2,30 <sup>a</sup> | 3,31 <sup>a</sup> | 1,80a |
| URM4412            | 0,30a        | 0,92b | 1,65b             | 2,49b             | 1,34b |
| <b>Tratamentos</b> |              |       |                   |                   |       |
| Confidor 700       | 0,45a        | 1,58a | 2,68a             | 3,80 <sup>a</sup> | 2,13A |
| Decis 25           | 0,39ab       | 1,23b | 2,16c             | 3,28c             | 1,76C |
| K-Othrine          | 0,37b        | 1,34b | 2,47b             | 3,58b             | 1,94B |
| Quimióleo          | 0,19c        | 0,65c | 1,17d             | 1,70d             | 0,93D |
| Sevin 480          | 0,08d        | 0,45d | 0,83e             | 1,35e             | 0,68E |
| Controle           | 0,40ab       | 1,34b | 2,51b             | 3,68ab            | 1,98B |
| <b>Médias</b>      | 0,31D        | 1,09C | 1,97B             | 2,90 <sup>a</sup> |       |
| <b>CV(a) %</b>     | 10,35        |       |                   |                   |       |
| <b>CV(b)%</b>      | 7,87         |       |                   |                   |       |
| <b>Tukey</b>       |              |       |                   |                   |       |
| <b>(P=0,05)</b>    |              |       |                   |                   |       |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variância.



**Figura 1.** Estimativas de crescimento de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412, independentemente do inseticida utilizado, em função do tempo.

Quanto à interação com os inseticidas, nos intervalos de tempo, independentemente da linhagem, Confidor (Imidaclopride) teve efeito sinérgico, evidenciado pelo maior crescimento da colônia quando comparado ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Neves *et al.* (2001) quando estudaram o efeito do Imidaclopride sobre *M. anisopliae* e verificaram que o produto não afetou a germinação dos conídios deste fungo, o que indica a possibilidade futura de utilização conjunta do controle biológico e químico nas dosagens adequadas. K-Othrine (Deltametrina) foi o inseticida que apresentou menor efeito inibitório sobre *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, apresentando médias semelhantes à testemunha. O maior efeito inibitório sobre o crescimento micelial das linhagens testadas, foi observado na interação com os defensivos Quimióleo e Sevin (Carbaril), diferindo significativamente do grupo controle.



A germinação dos conídios da linhagem URM3349 apresentou um menor aumento, embora não significativo, quando associada ao Sevin (Carbaril). Considerando observadas as reduções da germinação, quando da aplicação dos tratamentos, o uso do Quimióleo foi o que apresentou menor influência na redução dos percentuais de germinação (Tabela 3), enquanto o Decis (Deltametrina) foi o que apresentou maior ação de restrição à germinação, quando comparado ao demais inseticidas. Quanto à área da colônia, o Confidor (Imidaclopride) apresentou crescimento maior que as testemunhas, sendo que o Sevin (Carbaril), semelhante ao Quimióleo, apresentou maior redução de área. Avaliando o número de conídios foi visto que o Quimióleo apresentou uma redução de 63%, e o Sevin (Carbaril) de apenas 21% ficando os demais inseticidas no intermédio entre estes dois valores.

**Tabela 3.** Percentual de germinação dos conídios (média  $\pm$  desvio padrão), área da colônia (média  $\pm$  desvio padrão), após 12 dias de inoculação, e numero de conídios produzidos por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 crescidos a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  e 12 horas de fotofase, adicionados com inseticidas.

| Tratamentos      | Germinação         |         | Área da colônia    |         | Numero de conídios   |         |
|------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|----------------------|---------|
|                  | (%)                |         | (%)                |         | (%)                  |         |
|                  | (%)                | redução | (cm <sup>2</sup> ) | redução | (x.10 <sup>6</sup> ) | redução |
| <b>Controle</b>  | 89,6 $\pm$ 2,26a   | 0,00    | 4,04 $\pm$ 0,15b   | 0,00    | 75,0 $\pm$ 15,5a     | 0,00    |
| <b>Confidor</b>  | 77,2 $\pm$ 2,83ab  | -13,84  | 4,58 $\pm$ 0,15a   | +13,36  | 42,0 $\pm$ 8,48bc    | -44,00  |
| <b>Decis</b>     | 70,4 $\pm$ 9,05b   | -21,20  | 3,66 $\pm$ 0,11c   | -9,40   | 26,0 $\pm$ 8,48bc    | -65,33  |
| <b>K-Othrine</b> | 79,2 $\pm$ 10,18ab | -11,60  | 4,30 $\pm$ 0,15b   | +6,43   | 25,0 $\pm$ 4,24bc    | -66,66  |
| <b>Quimióleo</b> | 86,8 $\pm$ 1,70a   | -3,12   | 1,68 $\pm$ 0,10d   | -58,41  | 12,0 $\pm$ 0,00c     | -84,00  |
| <b>Sevin</b>     | 90,8 $\pm$ 1,70a   | +1,34   | 1,56 $\pm$ 0,17d   | -61,38  | 54,0 $\pm$ 14,14ab   | -28,00  |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise estatística dos resultados de *M. anisopliae* var. *acridum*, não apresentou variação significativa quanto aos percentuais de germinação para nenhum dos tratamentos aplicados, embora tenham apresentado diferentes valores. O Sevin (Carbaril) afetou significativamente a área da colônia, enquanto o Confidor, Decis (Deltametrina) e K-othrine apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si para a redução na área da colônia. Em relação ao número de conídios, Sevin (Carbaril) promoveu a redução de 81,25% em relação ao controle, os valores encontrados para Quimióleo foram estatisticamente semelhantes a aqueles resultantes do tratamento com Sevin, (Tabela 4, Figura 2 e 3). As menores interferências quanto à produção de conídios foram encontradas nos tratamentos com K-Othrine (Deltametrina) e Confidor (Imidaclopride). Estes dados corroboram a afirmativa de Batista Filho *et al.* (2001), relativa a não influência deste inseticida na produção de conídios de *M. anisopliae*. Roberts & Campbell (1977) discutem essas diferenças encontradas na literatura, considerando que a suscetibilidade dos fungos entomopatogênicos aos produtos químicos varia amplamente entre os inseticidas e os isolados dos fungos. Dentre os inseticidas testados, a produção de esporos foi bem mais elevada com K-Othrine (Deltametrina) e Confidor (Imidaclopride). Neves & Alves (1999) relataram a conidiogênese de *M. anisopliae* associada ao tratamento com Imidaclopride. Loureiro *et al.* (2002) verificaram a redução da esporulação de conídios de *M. anisopliae*, quando submetidos ao Imidaclopride, contudo resultados semelhantes não foram observados por Batista Filho *et al.* (2001) em seus trabalhos com *M. anisopliae*.

que afirmaram não haver interferência do produto sobre a produção de conídios.

**Tabela 4.** Percentual de germinação dos conídios (média  $\pm$  desvio padrão), área da colônia (média  $\pm$  desvio padrão), após 12 dias de inoculação, e número de conídios produzidos por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412 crescidos a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  e 12 horas de fotofase em meio adicionados com inseticidas.

| Tratamentos      | Germinação        |         | Área da colônia    |         | Numero de conídios   |         |
|------------------|-------------------|---------|--------------------|---------|----------------------|---------|
|                  | (%)               |         | (%)                |         | (%)                  |         |
|                  | (%)               | redução | (cm <sup>2</sup> ) | redução | (x.10 <sup>6</sup> ) | redução |
| <b>Controle</b>  | 94,00 $\pm$ 0,56a | 0,00    | 3,31 $\pm$ 0,33a   | 0,00    | 42,66 $\pm$ 0,56ab   | 0,00    |
| <b>Confidor</b>  | 77,20 $\pm$ 1,70a | -5,95   | 3,02 $\pm$ 0,17b   | -8,76   | 36,00 $\pm$ 1,70ab   | -15,61  |
| <b>Decis</b>     | 94,40 $\pm$ 2,26a | +0,42   | 2,88 $\pm$ 0,24b   | -13,00  | 22,66 $\pm$ 2,26bc   | -46,88  |
| <b>K-Othrine</b> | 83,60 $\pm$ 2,83a | -11,06  | 2,84 $\pm$ 0,15b   | -14,20  | 50,66 $\pm$ 2,83a    | +18,75  |
| <b>Quimióleo</b> | 83,60 $\pm$ 2,83a | -11,06  | 1,71 $\pm$ 0,14c   | -48,33  | 10,66 $\pm$ 2,83c    | -75,01  |
| <b>Sevin</b>     | 81,20 $\pm$ 0,56a | -13,62  | 1,14 $\pm$ 0,10d   | -65,50  | 8,00 $\pm$ 0,56c     | -81,25  |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, verificou-se que *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 foram compatíveis com o inseticida Confidor (Imidaclopride). Resultados semelhantes foram observados por Moino Jr. & Alves (1998), Neves *et al.* (2001) e Loureiro *et al.* (2002), ao avaliarem o efeito interativo desse princípio ativo sobre linhagens de *M. anisopliae*. Da mesma forma, Purwar & Sachan (2006) também observaram associação sinérgica entre o entomopatógeno e o inseticida, evidenciada pelo aumento da mortalidade do inseto *Spilarctia*

*obliqua* (Walker). Por outro lado, Batista Filho *et al.* (2001) classificaram como incompatível essa associação.

**Tabela 5.** Toxicidade e compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados em culturas de caupi para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em condições de laboratório.

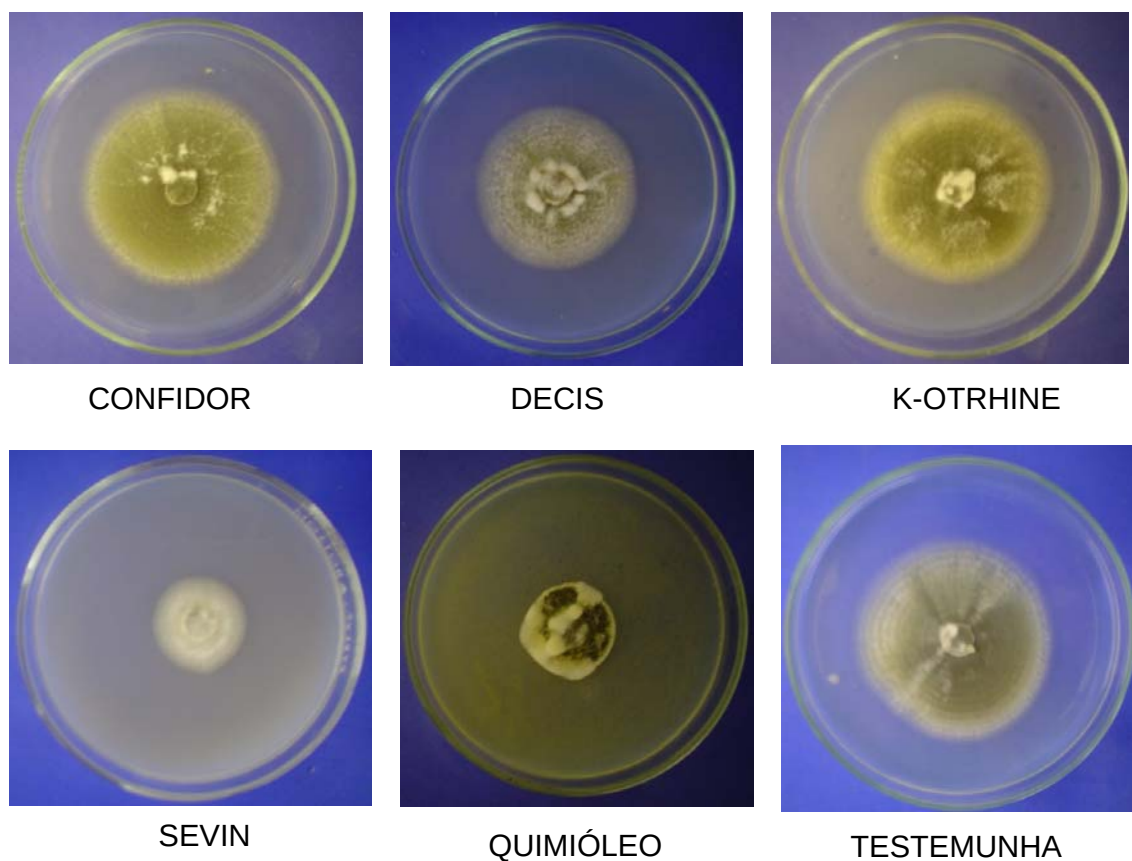
| Inseticidas      | Linhagens               |                   |            |      |
|------------------|-------------------------|-------------------|------------|------|
|                  | URM3349                 |                   | URM4412    |      |
|                  | Valor de T <sup>1</sup> | C. T <sup>2</sup> | Valor de T | C. T |
| <b>Confidor</b>  | 79,88                   | C                 | 74,26      | C    |
| <b>Decis</b>     | 61,20                   | C                 | 52         | MdT  |
| <b>K-Othrine</b> | 125,89                  | C                 | 56,16      | MdT  |
| <b>Quimióleo</b> | 28,57                   | MT                | 25,82      | MT   |
| <b>Kevin</b>     | 22,97                   | MT                | 80,62      | C    |

<sup>1</sup> Valor de T, segundo fórmula proposta por Alves *et al.* (1998).

<sup>2</sup> Classificação Toxicológica: MT = Muito Tóxico; T= Tóxico; MdT = Moderadamente Tóxico; C = Compatível

Os inseticidas pertencentes ao grupo Deltametrina (Decis e K-Othrine) comportaram-se diferentemente para as linhagens testadas. Os produtos foram seletivos aos fungos, sendo classificado como moderadamente compatível (*M. anisopliae* var. *acridum*) e compatível (*M. anisopliae* var. *anisopliae*). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Batista Filho *et al.* (2001) para *M. anisopliae* SPL42. Contudo, o óleo vegetal (Quimióleo) utilizado neste experimento apresentou valores de T inferiores a 30, sendo classificados de acordo com a fórmula proposta por Alves *et al.* (1998) como muito tóxico para as duas linhagens testadas. Esses resultados diferem dos apresentados por

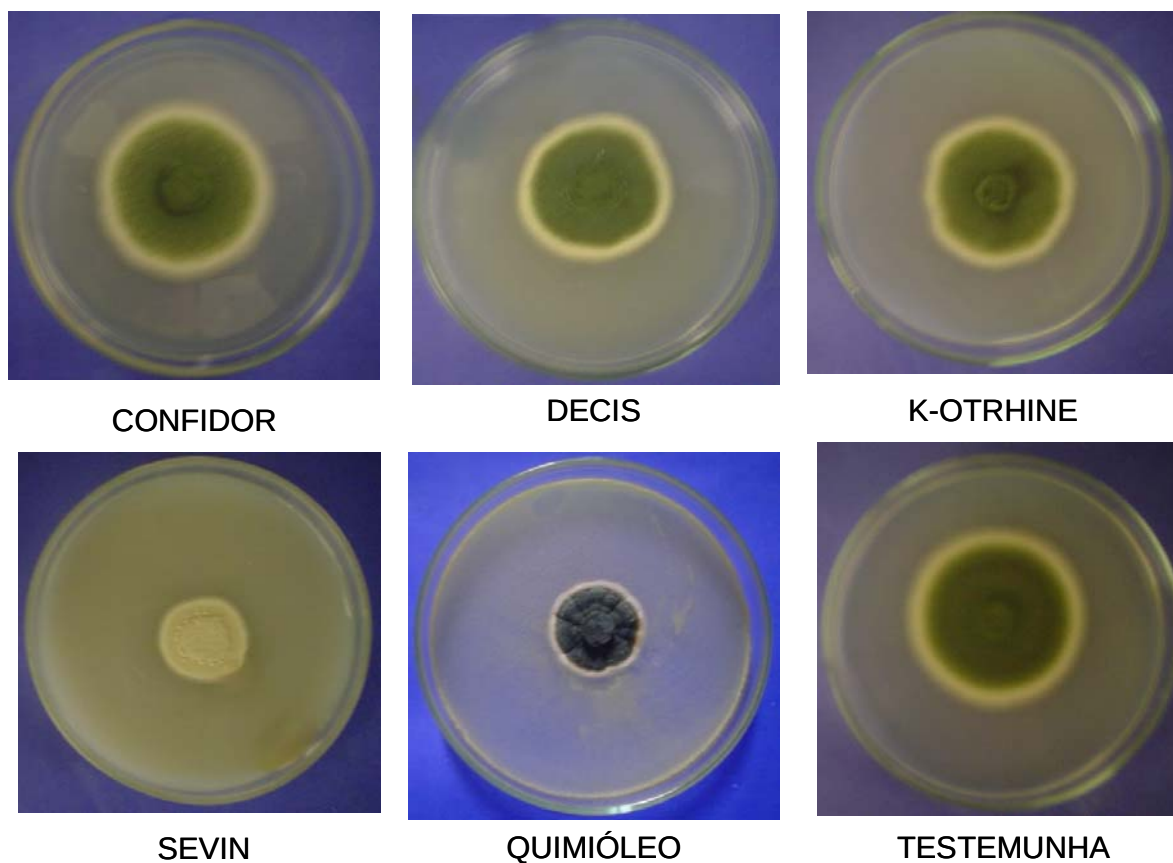
Hirose *et al.* (2001), os quais encontram valor de T igual a 49,14, classificando o defensivo como moderadamente tóxico quanto ao efeito fungitóxico sobre as linhagens.



**Figura 2.** *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 crescidos a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 horas de fotofase e UR  $75 \pm 5\%$ , em BDA + inseticidas, após 12 dias.

Quanto à seletividade do defensivo agrícola Sevin (Carbaril) sobre as linhagens utilizadas no experimento, observou-se que este se mostrou compatível para *M. anisopliae* var. *acridum* e incompatível (muito tóxico) para *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Os resultados obtidos demonstram que a ação

deste produto fitossanitário sobre o crescimento micelial e a produção de conídios variou em função das linhagens utilizadas. Este fato foi, também, constatado por Batista Filho *et al.* (2003) ao avaliar os efeitos de inseticidas químicos sobre fungos entomopatogênicos.



**Figura 3.** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412 crescidos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 horas de fotofase e UR  $75 \pm 5\%$ , em BDA + inseticidas, após 12 dias.

A maioria dos trabalhos realizados visando detectar o efeito de inseticidas químicos sobre os entomopatógenos foi conduzida em laboratório. Apesar disso, os estudos *in vitro* têm a vantagem de expor, ao máximo, o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições

de campo. Assim, constatada a inocuidade de um agrotóxico em laboratório, não há dúvidas sobre sua seletividade (Alves *et al.* 1998). Dessa forma, espera-se que os produtos considerados seletivos neste experimento também apresentem a mesma interação positiva quando aplicados no campo.

Deste modo, é possível avaliar a capacidade do fungo em expressar a compatibilidade com os inseticidas químicos, demonstrando a sua amplitude de tolerância, abrindo a possibilidade do seu emprego em associação com o fungo.

Os resultados obtidos mostraram que a ação dos produtos fitossanitários sobre o crescimento vegetativo, esporulação e germinação variou em função da natureza química dos produtos e das linhagens testadas. *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi compatível com os inseticidas Confidor, Decis e K-Othrine e *M. anisopliae* var. *acridum* foi compatível com os inseticidas Confidor e Sevin. A produção de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum*, URM4412 não foi afetada pela aplicação com K-Othrine (Deltametrina). As linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* têm comportamento diferenciado quanto à percentagem de germinação, área da colônia e produção de conídios, sendo o Confidor o inseticida que melhor se adequou aos fungos testados.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CENARGEN-EMBRAPA (Área de Controle Biológico) pela concessão da linhagem *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* CG<sub>291</sub> e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro às pesquisas.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque, A. C., K. C. A. Pereira, F. M. Cunha, A. S. L. Veiga, A. C. R. Athayde & E. A. Luna-Alves Lima. 2005.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoenses* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Biol. Control, 34: 585-591.
- Alves, S. B. & R. E. Lecuona. 1998.** Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. p 217-238. In: S.B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo, FEALQ, 1163p.
- Alves, S. B. & S. A. Moraes. 1998.** Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. p.765-777. In: S.B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo, FEALQ, 1163p.
- Alves, S. B. & R. M. Pereira. 1998.** Produção de fungos entomopatogênicos. p. 845-869. In: S.B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo, FEALQ, 1163p.
- Alves, S. B., A. Moino Júnior & J. E. M. Almeida. 1998.** Produtos fitossanitários e entomopatógenos. p. 217-238. In: S.B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo, FEALQ, 1163p.
- Andrade Júnior, A. S., A. A. Santos, C. A. Sobrinhos, E. A. Bastos, F. B. Melo, F. M. P. Viana, F. R. Freire Filho, J. S. Carneiro, M. M. Rocha, M. J. Cardoso, P. H. S. Silva & V. Q. Ribeiro. 2005.** Cultivo de feijão-caupi. Embrapa Meio Norte, Teresina. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm>>.



- Azevedo, J. L. 2001.** O uso de fungos na biotecnologia. p. 297-317. In: Serafin, L. A., N. M Barros & J. L. Azevedo. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Livraria e Editora. 402p.
- Barreto, R. S., E. J. Marques, M. G. C. Gondim Jr. & J. V. Oliveira. 2004.** Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. For the control of the mite *Mononychellus tanajosa* (Bondar). Sci. Agric. 61: 659-664.
- Batista Filho, A., J. E. M Almeida & C. Lamas. 2001.** Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. Neotrop. Entomol. 30: 437-447.
- Batista Filho, A., Z. A. Ramiro, J. E. M Almeida, L. G. Leite, E. R. R. Cintra & C. Lamas. 2003.** Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais, 70: 61-67.
- Euclides, R. F. 1985.** Manual de utilização do Programa SAEG (Sistema para análises estatísticas e genéticas), Viçosa: Minas Gerais, 59p, versão 5.0.
- Figuerêdo, M. F. S., E. J. Marques, R. O. R. Lima & J. V. Oliveira. 2002.** Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia Licus* (Drury) (Lepdoptera: Castniidae). Neotrop. Entomol. 31: 397-403.
- Hirose, E., P. M. O. J. Neves, J. A. C. Zequi, L. H. Martins, C. H. Peralta & A. Moino Jr. 2001.** A effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Braz. Arch. Biol. Technol. 44: 419-423.

- Kaaya, G. P. 1989.** *Glossinia morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. *Acta Trop.* 46, 107-114.
- Lacey, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya & P. Vails. 2001.** Insects pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control*, 21: 230-248.
- Loureiro, E. S., A. Moino Jr., A. Arnosti & G. C. Souza. 2002.** Efeitos de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. *Neotrop. Entomol.* 31: 263-269.
- Marques, R. P., A. C. Monteiro & G. T. Pereira. 2004.** Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). *Cien.. Rural*, 34: 1675-1680.
- Melo, I. S. & J. L. Azevedo. 2000.** Controle biológico. Jaguariúna, São Paulo: EMBRAPA Meio Ambiente, 388p.
- Moino Jr., A & S. B. Alves. 1998.** Efeito de idacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *An. Soc. Entomol. Bras.* 27: 611-619.
- Moraes, G. J. & F. S. Ramalho. 1980.** Alguns insetos associados a *Vigna unguiculata* (L.) Walp no Nordeste. Petrolina. EMBRAPA/CPTSA. 10p.
- Neves, P. J. & S. B. Alves. 1999.** Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidaclopride. *Sci. Agric.* 56: 301-311.

- Neves, P. M. O. J., E. Hirose, P. T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotrop. Entomol.* 30: 263-268.
- Puwar, J. P. & G. C. Sachan. 2006.** Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia oblique* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiol. Res.* 161: 38-42.
- Quesada-Moraga, E., R. Santos-Quirós, P. Valverde-García. & C. Santiago-Álvarez. 2004.** Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 97: 51-58.
- Roberts, D. W. & A. S. Campbell. 1977.** Stability of entomopathogenic fungi. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.*, 10: 19-76.
- Tefera, T. & K. L. Pringle, 2003.** Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera:Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *J. Invertebr. Pathol.* 84: 220-225.
- Tomé, P. H. F., R. A. Gonçalves, J. P. Santos, L. C. Cabral & D. S. Santos. 2001.** Controle de *Zabrotes subfasciatus* B. (Coleoptera: Bruchidae) em todas as fases do desenvolvimento pela atmosfera controlada com CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, em feijão. *Rev. Bras. Armaz.* 26: 3-9.

## CAPÍTULO II

**Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver, Milner & Trueman Sobre o  
*Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera:Bruchidae).**

**Manuscrito a ser enviado para a revista**

**JOURNAL OF STORED PRODUCTS RESEARCH**

Carlos Fernando Rodrigues Guaraná

Área de Ecologia, Departamento de Biologia,

Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE,

Rua Dom Manuel de Medeiros S/N, Dois Irmãos,

CEP 52171-900, Recife, PE.

[guarana@db.ufrpe.br](mailto:guarana@db.ufrpe.br)

Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver, Milner & Trueman Sobre o  
*Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera:Bruchidae).

Carlos F. R Guaraná.<sup>1</sup>; Francisco B. da Paz Jr.<sup>2</sup>; Elza A. Luna-Alves Lima<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Departamento de Biologia,  
Área de Ecologia, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, CEP 52171-900,  
Recife, PE. Brasil. [www.ufrpe.br](http://www.ufrpe.br), [guarana@db.ufrpe.br](mailto:guarana@db.ufrpe.br)

<sup>2</sup>CEFETPE UNED Pesqueira Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE, CEP 55200-  
000 PE, Brasil. [www.cefetpesqueira.edu.br](http://www.cefetpesqueira.edu.br), [fbpjuniior@cefetpesqueira.edu.br](mailto:fbpjuniior@cefetpesqueira.edu.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Centro de Ciências Biológicas,  
Departamento de Micologia, Av. Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP  
50670-420, Recife, PE. Brasil. [www.ufpe.br](http://www.ufpe.br), [ealal@bol.com.br](mailto:ealal@bol.com.br)

Patogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver, Milner & Trueman on the *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera:Bruchidae).

#### ABSTRACT

Pathogenic action of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412 on adults of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae), woodworm of bean in the concentrations of  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  and  $10^4$  conidia.mL<sup>-1</sup>, under conditions of temperature of  $28 \pm 2$  °C, relative humidity (UR) of  $70 \pm 5\%$  and photophase of 12 hours. The insects were established in laboratory with natural diet of bean cowpea *Vigna unguiculata*. All concentrations provoked mortality in the concentration of  $10^8$  conidia.mL<sup>-1</sup>, *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *acridum* showed media values of 74.45 and 58.27%, respectively. The CL<sub>50</sub> of *M. anisopliae* var. *anisopliae* was estimated in about  $9.2 \times 10^3$  conidia.mL<sup>-1</sup>. However, the data from *M. anisopliae* var. *acridum* were not adequate to the model of Probit analysis. The result confirmed that these agents have pathogenic action to the woodworm of bean, should be used in programs of biological control.

KEY WORDS: entomopathogenic fungi, biological control, *Vigna unguiculata*, cowpea.

## RESUMO

A ação patogênica de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412 sobre adultos de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), vulgarmente conhecido como caruncho do feijão, foi investigada nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, sob condições de temperatura de  $28 \pm 2$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12 horas. Os insetos foram criados em laboratório com dieta natural de feijão caupi *Vigna unguiculata*. Todas as concentrações causaram mortalidade na concentração de  $10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* apresentaram valores médios de 74,45 e 58,27%, respectivamente. A CL<sub>50</sub> de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi estimada em cerca de  $9,2 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Entretanto, os dados obtidos com *M. anisopliae* var. *acridum* não se adequaram ao modelo de análise de Probit. Os resultados confirmam que esses agentes possuem ação patogênica para o caruncho do feijão, podendo ser utilizados em programas de controle biológico.

## RESUMO –

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, controle biológico, *Vigna unguiculata*, caupi.

## 1. Introdução

*Callosobruchus maculatus* é uma das principais pragas que ataca o feijão caupi, feijão-de-corda ou macassar (*Vigna unguiculata*), destacando-se como o caruncho mais importante que ocorre no Nordeste brasileiro, onde grande parte do feijão plantado pertence a esse gênero. O caupi é uma cultura de grande importância para o Brasil por se constituir em alimento largamente utilizado pelas populações rural e urbana, apresentando alto valor protéico, custo comercial acessível, superando em termos nutricionais o feijão comum. Gerando vários subprodutos, dentre os quais, grãos e vagens verdes, e grãos secos. Suas folhas e ramos são utilizados como complemento na alimentação animal. É uma planta que tem a capacidade de fixar nitrogênio no solo, sendo muitas vezes utilizada em consórcio com outras culturas e na melhoria de solos que possuem baixa fertilidade. A sua massa verde pode ser reincorporada aos solos, sendo utilizada como fonte de matéria orgânica (Andrade Júnior et al. 2005).

Os carunchos ao atacar os grãos de caupi podem eventualmente destruir o embrião da semente, afetando diretamente a germinação, além de conferir sabor desagradável ao produto. Os prejuízos financeiros advindos da contaminação por esses insetos demonstram-se, principalmente, em alterações no peso e no tipo dos grãos, danos indiretos que tendem a facilitar a ocorrência de microrganismos e ácaros, aquecimento da massa de grãos, perda de peso e de valor nutritivo, sendo desvalorizado comercialmente (Magalhães e Carvalho, 1988; Oliveira Júnior et al. 2000).



O combate ao caruncho têm sido realizado principalmente com o emprego de produtos químicos, que devido ao uso inadequado tem causado a necessidade de reaplicação dos pesticidas, em quantidades cada vez maiores, elevando os custos com este tipo de tratamento, perdas de produtos devido ao controle ineficiente, contaminação dos alimentos e agricultores (Athié e De Paula, 2002). Outros métodos têm sido empregados, tais como a misturas dos grãos do caupi com cinza de madeira, uso de pimenta-do-reino, substâncias oleaginosas, entre outras. Esses métodos são em geral limitados ou pouco eficazes (Vieira, 1988). Os microrganismos entomopatogênicos surgem como uma nova alternativa de eficácia comprovada em vários outros tipos de controle de insetos. Não poluindo o ambiente, não sendo tóxicos ao homem, apresentando efeitos mais duradouros, além de persistirem no ambiente, podendo ser utilizados com inseticidas seletivos.

Alves et al. 1998, considera que para a maior eficiência e sucesso nos programa de controle microbiano de insetos, se faz necessário a seleção de isolados de fungos altamente virulentos visando o controle de pestes de culturas econômicas, uma vez que a grande variabilidade desses organismos é uma das principais vantagens nesse tipo de programas.

Desta forma, a pesquisa teve por objetivo avaliar a patogenicidade dos isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (URM3349) e *M. anisopliae* var. *acridum* (URM4412) sobre o caruncho de adultos de *Callosobruchus maculatus*.

## 2. Material & Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia e Manejo Animal do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

**2.1 Linhagens fúngicas utilizadas.** *M. anisopliae* var. *anisopliae* (PL43) isolada originariamente de *Mahanarva posticata* (Stal.), em Alagoas e *M. anisopliae* var. *acridum* (CG291) isolada originariamente de *Austracnis guttulosa* (Walker), Austrália. Os isolados estão depositados na Coleção de Culturas Micoteca-URM do Departamento de Micologia, CCB, UFPE sob os seguintes números de acessos *M. anisopliae* var. *anisopliae* (URM3349) e *M. anisopliae* var. *acridum* (URM4412).

**2.2 Obtenção e criação dos insetos.** A criação de insetos foi desenvolvida, a partir de matrizes cedidas da criação do Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da UFRPE. Os adultos foram criados em recipientes de vidro com capacidade aproximada de 1L, fechados com tecido fino do tipo "Voil" para possibilitar a aeração. Os insetos foram confinados durante quatro dias para realizarem a postura, em seguida retirados e os recipientes estocados até a emergência dos adultos. Este procedimento foi realizado por sucessivas gerações, para assegurar a quantidade necessária de adultos a fim de executar a pesquisa. O experimento foi realizado em sala com temperatura de  $28 \pm 2$  °C, umidade relativa

(UR) de  $70\pm 5\%$  e fotofase de 12 horas. A dieta alimentar foi baseada em grãos de caupi. Os grãos foram acondicionados em sacos plásticos devidamente etiquetados e mantidos em freezer por um período de 72 horas, a fim de se eliminar as possíveis infestações oriundas do campo.

**2.3 Preparo das suspensões fúngicas.** As suspensões iniciais usadas na infecção de *C. maculatus*, foram preparadas com conídios viáveis mais espalhante adesivo ("tween" 80 a 0,05%), nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  conídios/mL, determinada em câmara de *Neübauer* sob microscópio ótico, conforme método de quantificação utilizado por Alves e Moraes (1998).

**2.4 Teste de patogenicidade.** O experimento foi realizado em laboratório ( $28\pm 2^\circ$  C,  $70\pm 5\%$  UR e 12 horas de fotofase), em delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos correspondendo às concentrações  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  conídios/mL e um grupo controle (água destilada esterilizada + "Tween" 80 a 0,05 % v/v), e dez repetições, sendo cada parcela composta de 10 insetos, totalizando 100 insetos por tratamento para as linhagens selecionadas.

Cada suspensão foi agitada por aproximadamente dois minutos em Vortex e, em seguida, quantificada em câmara de *Neübauer* utilizando o campo de contagem 4, de acordo com Alves e Moraes (1998). A inoculação dos insetos foi feita por aspersão de conídios dos patógenos com o auxílio de mini pulverizadores manuais, utilizando 0,5 mL da suspensão por parcela. A avaliação foi realizada durante nove dias.

**2.5 Reisolamento dos patógenos.** Os cadáveres foram lavados com soluções de hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos, em álcool a 70% por três minutos, e em água destilada autoclavada por três minutos, depois foram transferidos para placas de Petri (6,5 x 2,5 cm) forradas com papel filtro esterilizado, e umedecido em água destilada autoclavada, sendo então mantidos em câmara úmida para confirmação do agente causal.

Os cadáveres foram observados sob microscópio estereoscópio para confirmação da mortalidade e ocorrência da conidiogênese no 10º dia após a incubação. Depois desse procedimento, as estruturas fúngicas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Agar da Oxoid mais antibiótico (BDA+A). Cloranfenicol (2%) foi o antibiótico utilizado. Após doze dias do crescimento fúngico.

**2.6 Análise estatística.** Os dados referentes à mortalidade foram submetidos à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 5.0 (Euclides, 1985). Para determinação da TL<sub>50</sub> (tempo necessário para matar 50% dos indivíduos) dos isolados, as mortalidades foram submetidas a análise de Probit empregando-se o programa POLO PC (LeOra Software).

### 3. Resultados & Discussão

A patogenicidade dos isolados de *M. anisopliae* foi determinada pela percentagem média de mortalidade, que variou de 6 a 92,4%, decorridos os onze dias de inoculação. Embora existam relatos na literatura de que os insetos adultos de *C. maculatus* apresentam sobrevivência de 7 a 9 dias (Gallo et al. 2002), nas condições laboratoriais trabalhadas neste experimento foi observada uma sobrevivência superior a onze dias para os insetos. Dados semelhantes foram observados por Cherry et al. (2005) ao analisarem a mortalidade diária dos insetos, imersos em suspensão aquosa com *M. anisopliae*, durante doze dias.

**Tabela 1.** Percentual médio de mortalidade de *Callosobruchus maculatus* tratados com diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* independente da linhagem estudada.

| Linhagem | Concentrações (Conídios/mL) |                 |                 |                 |                 | Média   |
|----------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
|          | 10 <sup>4</sup>             | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>7</sup> | 10 <sup>8</sup> |         |
| URM3349  | 33,63aC                     | 34,90aC         | 57,72aB         | 69,18aAB        | 74,45aA         | 53,98aA |
| URM4412  | 34,81aC                     | 40,36aBC        | 41,81bBC        | 48,27bAB        | 58,27bA         | 44,70bB |
| CV       | 23,75*                      |                 |                 |                 |                 |         |
|          | 12,12**                     |                 |                 |                 |                 |         |

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05). \* URM3349 - \*\*URM4412.

CV = coeficiente de variância.

De acordo com os dados da Tabela 1, ocorreu interação significativa entre as linhagens dentro de cada concentração, expressada pelo aumento considerável na mortalidade dos insetos à medida que se aumentava a concentração de conídios das suspensões. Não ocorreram diferenças significativas

entre as duas variedades testadas nas concentrações de  $10^4$  e  $10^5$  conídios/mL, entretanto, para as demais concentrações os percentuais médios de mortalidade foram significativamente diferentes entre si.

Comparando-se a mortalidade acumulada de *C. maculatus* provocada pelas linhagens de *M. anisopliae* utilizadas nesse experimento, verifica-se que as duas foram patogênicas, porém a linhagem URM4412 foi menos virulenta, provocando 50% de mortalidade dos insetos em tempo mais prolongado. A linhagem URM3349 comportou-se como mais patogênica ao inseto alvo, matando mais de 50% dos indivíduos tratados já nas primeiras 120 horas após inoculação dos fungos. Barreto *et al.* 2004 também usaram esses parâmetros para identificar a linhagem mais patogênica. Para a linhagem URM4412, os percentuais de mortalidade superior a 50% dos insetos foram observados somente a partir do sétimo dia. Contudo, não houve diferença significativa entre os percentuais médios de mortalidade das duas linhagens do nono ao décimo segundo dia após inoculação fúngica (Figura 1).

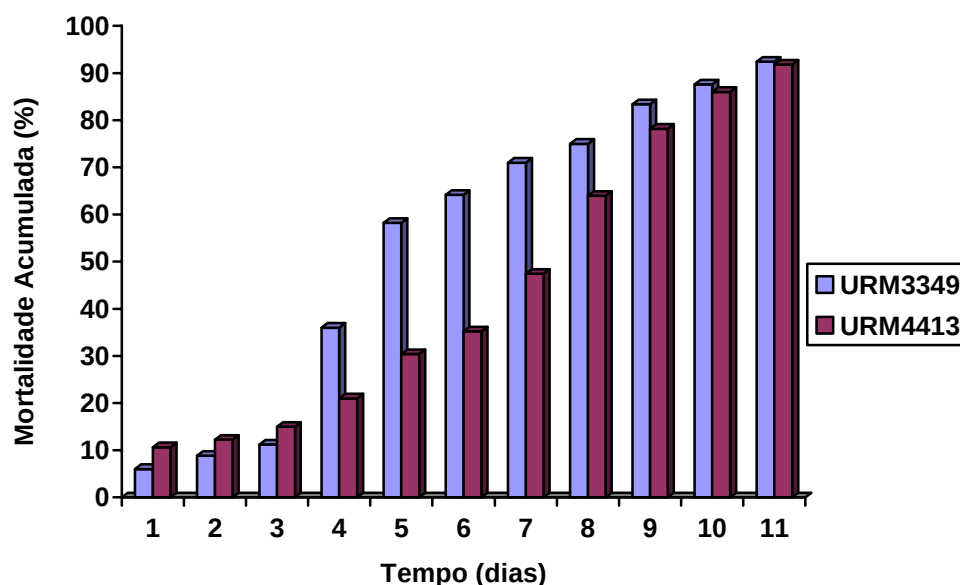


Figura 1. Comparação dos percentuais médios de mortalidade entre as linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* URM4412 em função do tempo no decorrer de onze dias após inoculação dos fungos.

Analisando a ação patogênica das linhagens, em função do tempo, observou-se que as duas linhagens foram virulentas. A mortalidade dos insetos adultos de *C. maculatus* tratados com as linhagens URM3349 e URM4412 de *M. anisopliae*, em função do tempo após a inoculação, ocorreu pelo modelo polinomial cúbico (Figuras 2 e 3).

A patogenicidade de *M. anisopliae* sobre o *C. maculatus* também foi avaliada por Cherry et al., (2005) em laboratório, que realizaram bioensaios por imersão nas mesmas concentrações utilizadas neste trabalho, diferindo no método de aplicação, por haveremos utilizado a pulverização. Tendo obtido no sexto dia de observação, para o isolado de *M. anisopliae* estudado, percentuais de mortalidade acumulada não corrigida variando de 29,99 a 83,33%, enquanto obtivemos também

no sexto dia, valores que variaram de 23 a 100% no isolado URM3349 e 20 a 53% no isolado URM4412 para as concentrações  $10^4$  e  $10^8$  conídios/mL respectivamente.

Para a linhagem URM3349 (PL<sub>43</sub>), os tempos letais observados foram decrescentes à medida que aumentou as concentrações, com exceção para as duas menores concentrações trabalhadas neste experimento. Na concentração  $10^4$  conídios/mL, o tempo letal que ocorresse mortalidade de pelo menos 50% dos indivíduos tratados ficou compreendido entre o 8º e o 9º dia, não atingindo a mortalidade máxima (100%) no decorrer do experimento. Na concentração  $10^5$  a TL<sub>50</sub>, também ficou situada entre o 8º e o 9º dia após a inoculação fúngica.

Quanto à concentração  $10^6$  conídios/mL, observou-se mortalidade superior a 50% dos indivíduos a partir do 5º dia após inoculação. Usando a mesma linhagem nesta mesma concentração, sobre soldados e operários de *Nasutitermes coxipoensis*, Albuquerque et al. (2005) observaram tempo letal médio inferior ao 1º dia de inoculação. Todavia, as variações nos mecanismos de defesa desses diferentes artrópodes podem expressar respostas diferenciadas a um mesmo agente patogênico. Em função de poucas referências sobre o uso de *M. anisopliae* para o controle do caruncho do caupi, considerou-se também o efeito desse entomopatógeno sobre outros artrópodes.



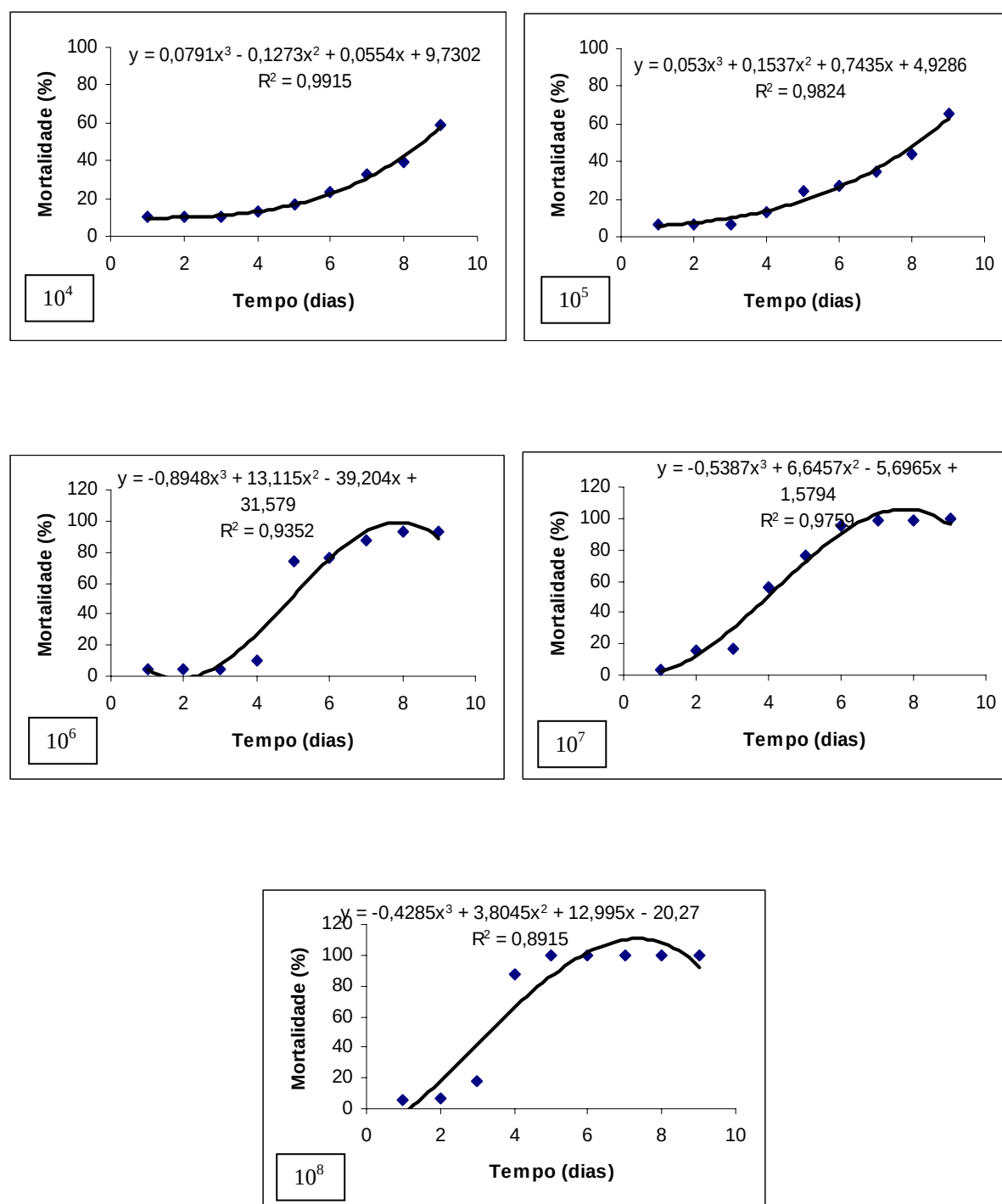


Figura 2. Percentual médio de mortalidade acumulada de *Callosobruchus maculatus* em função das concentrações de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (URM3349) e do tempo após a inoculação nos insetos.

A mortalidade máxima (100%) dos insetos adultos de *C. maculatus* com os tratamentos,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL ocorreram, respectivamente, no 9º e no 5º dia após o início dos tratamentos, seguido de estabilização da curva, pois não houve mais mortes. Loureiro & Monteiro (2005) verificaram, em seus experimentos com soldados de formigas, mortalidade máxima ocorrendo até o 4º após inoculação. Os tempos letais medianos desse experimento observados foram inferiores ao terceiro dia nas concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL. Contudo Reis et al. (2001), observaram mortalidade inferior a 65% com o isolado 959 de *M. anisopliae* sobre adultos de *Amblyomma cajennense*.

Os tempos letais medianos obtidos nesse experimento foram inferiores ao terceiro dia nas concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL. Figuerêdo et al. (2002), avaliaram a patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* sobre a broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus*, sendo de 7,3 dias o menor valor da  $TL_{50}$ .

Os resultados encontrados nesta pesquisa demonstram relação diretamente proporcional entre a quantidade de conídios aplicada no *C. maculatus* e a mortalidade do mesmo. Esse fato também foi constatado por diversos autores ao estudarem isolados desse mesmo fungo em diferentes espécies de insetos (Alves et al., 1985; Silva et al., 2003) Segundo Fernandes & Alves, 1992 quanto mais conídios penetram, mais toxinas ou enzimas são liberadas, aumentando a mortalidade do inseto. Entretanto a velocidade de ação do fungo depende, além da dosagem, das espécies hospedeiras envolvidas (Sosa-Gómez & Moscardi, 1992). Segundo ST. Leger (1991), a variação da virulência de isolados de fungos entomopatogênicos está relacionada com a composição química da cutícula e os processos bioquímicos

envolvidos para a formação do tubo germinativo e colonização do hospedeiro. Além disso, Oliveira et. al., (2004) destacaram que a capacidade do fungo em causar mortalidade se deve à habilidade de seus conídios em reconhecer e produzir enzimas para degradar a cutícula do hospedeiro.

De um modo geral observou-se um incremento significativo na percentagem de mortalidade do caruncho do feijão com o aumento da dose do fungo (Figura 3). O isolado URM4412, em todas as doses testadas, causou mortalidade de *C. maculatus* com média variando de 34,82 a 58,27%.

O isolado de *M. anisopliae* URM3349 foi o mais patogênico para *C. maculatus* a partir do qual foi possível calcular a  $TL_{50}$  e a  $CL_{50}$ , entretanto os dados obtidos pelo isolado URM4412 não se ajustaram ao modelo de Probit, provavelmente porque os bioensaios nem sempre seguiram o modelo do tipo estímulo-resposta (Haddad, 1998).

Pela análise de Probit, as linhagens testadas não se adequaram ao modelo, por ter ocorrido um  $\chi^2$  significativo e elevada heterogeneidade dos dados. Em experimentos com microrganismos, nem sempre se observa um modelo linear na relação estímulo/resposta, o que dificulta a análise através desse modelo (PAZ JÚNIOR, 2006).

Embora esses dados sejam de certa forma conflitantes, esses isolados apresentam potencial para serem empregados visando o controle de *C. maculatus* em condições de campo.

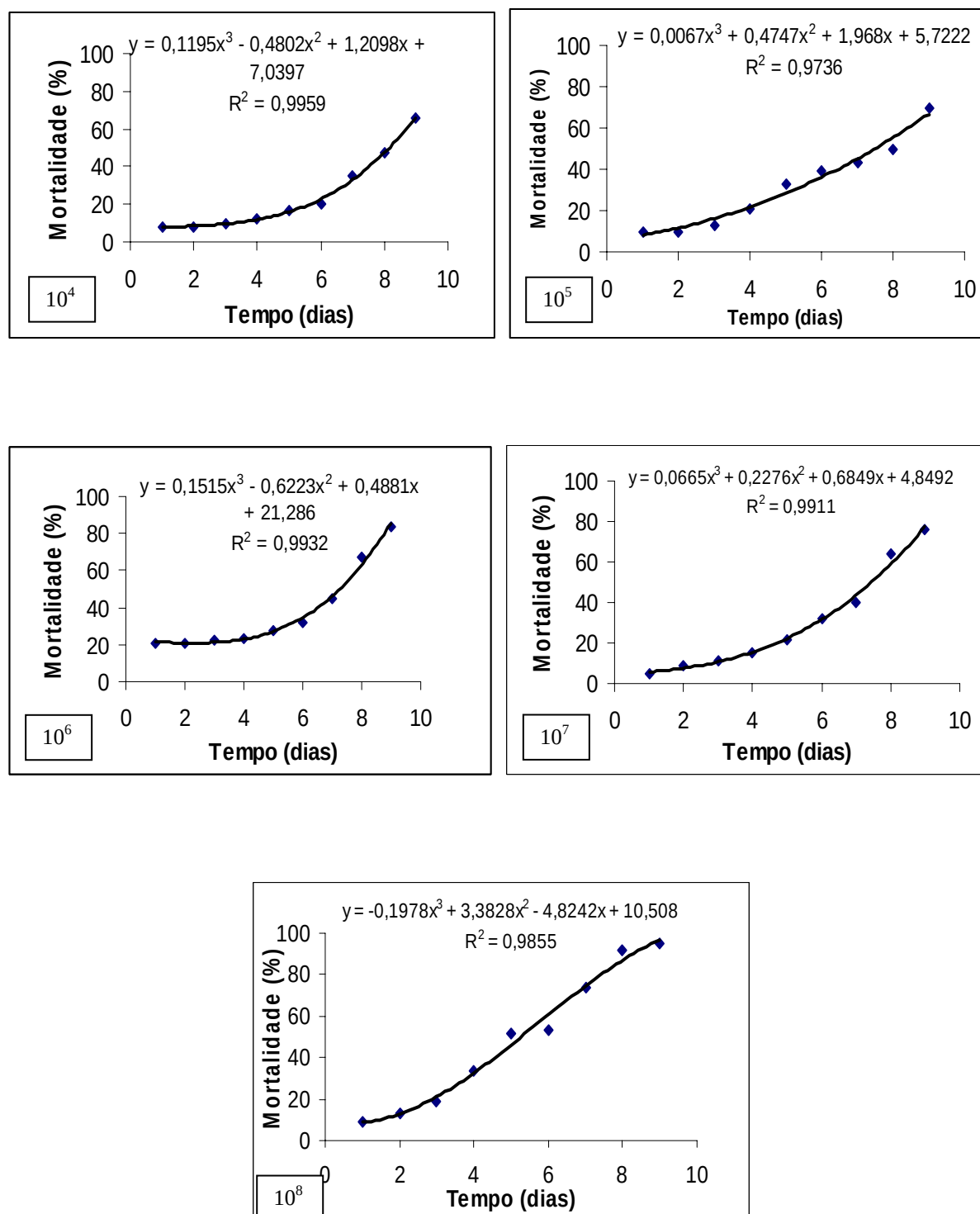


Figura 3. Percentual médio de mortalidade acumulada de *Callosobruchus maculatus* em função das concentrações de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (URM4412) e do tempo após a inoculação nos insetos.

#### 4. Referências Bibliográficas

Albuquerque, A. C., K. C. A. Pereira, F. M. Cunha, A. S. L. Veiga, A. C. R. Athayde & E. A. L. A. Lima. 2005. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoenses* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Biological Control*, 34: 585-591.

Alves, S. B. & S. A. Moraes. 1998. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. pp. 765-777. In: S.B. Alves (ed.). *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, FEALQ, 1163p.

Alves, S. B., A. Moino Júnior & J. E. M. Almeida. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. pp. 217-238. In: S.B. Alves (ed.). *Controle Microbiano de insetos*. São Paulo, FEALQ, 1163p.

Alves, S.B. 1985 Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, .20(4), 403-406.

Andrade Júnior, A. S.; Santos, A. A.; Sobrinhos, C. A.; Bastos, E. A.; Melo, F. B.; Viana, F. M. P.; Freire Filho, F. R.; Carneiro, J. S.; Rocha, M. M.; Cardoso, M. J.; Silva, P. H. S.; Ribeiro, V.Q. *Cultivo de feijão-caupi*. Embrapa Meio Norte, Teresina.

Disponível

em:

<

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm>> Acesso em: 27 de jun de 2006.

Athié, I.; De Paula, D. C. 2002. Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação. 2 ed., São Paulo: Livraria Varela, pp 244.

Cherry, A. J.; Abalo, P.; Hell, K. 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. Journal of Stored Products Research 41, 295-309.

Euclides, R. F. 1985. Manual de utilização do Programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), Viçosa: Minas Gerais, 59p, versão 5.0.

Fernandes, P.M.; Alves, S.B. 1992 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera-Termitidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 21(3), 319-328.

Figuerêdo, M. F. S.; Marques, E. J.; Lima, R. O. R.; Oliveira, J. 2002. V. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metahrizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castaniidae). Neotropical Entomology. 31, 397-403.

Gallo, D.; Nakano, O.; Neto, S. S.; Carvalho, R. P. L.; Baptista, G. C.; Berti Filho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B., Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, S. 2002. Entomologia Agrícola, 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, pp.837-838.

Haddad, M.L. 1998. Utilização do Polo-PC para análise de Probit, pp.21-38. In S.B. Alves, Controle microbiano de insetos, Piracicaba, Fealq, 2ed., 1163p.

Loureiro, E. S.; Monteiro, A.C. 2005. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: formicidae). Revista Árvore. 29, 553-561.

Magalhães, B. P.; Carvalho, S. M.. 1988. Insetos associados à cultura. In: Zimmermann, M. J. O.; Rocha, M.; Yamada, T. (Ed.) Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba. Associação Brasileira para Pesquisa do Potassa e do Fosfato pp.573-589.

Oliveira Júnior, J. O. L.; Medeiros, R. D.; Moreira, M. A. B. 2000. A cultura do Feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Estado de Roraima. Ano VI – Nº 01. Embrapa – Centro de Pesquisa Agroflorestal de Roraima.25 p.

Oliveira, R.C. de; NEVES, P. M. O. J.; ALVES L. F. A. 2004 Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). Neotropical Entomology, 33(3), 347-351.

Paz Júnior, F. B. da Ação Patogênica de Linhagens de *Beuaveria bassiana* ao *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae), Análise Genética (PCR) e Compatibilidade Química. 2006. 95 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco.

Reis, R. C. S.; Melo, D. R.; Souza, E. J.; Bittencourt, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beuaveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyoma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 53(5), 544-547.

Silva, V.C.A. 2003 Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Neotropical Entomology, 32(4), 653-658.

Sosa-Gómez, D.R.; Moscardi, F. 1992 Epizootiologia: chave dos problemas para o controle microbiano com fungos. In: Simpósio de Controle Biológico, 3., 1992, Águas de Lindóia. Anais... Jaguariúna : Embrapa-CNPDA, 64-69.

ST. Leger, R.J.; Goettel, M.; Roberts, D. W.; Staples, R. C. 1991 Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 58, 168-179.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: imprensa Universitária, UFV, 231p. 1988.



## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- Os inseticidas Confidor, Decis e K-otrhone, foram compatíveis com *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349, enquanto *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412 foi compatível com os inseticidas Confidor e Sevin;
- A produção de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum*, URM4412 não foi afetada pela aplicação com k-otrhone (Deltametrina);
- As linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* URM3349 e *M. anisopliae* var. *acridum* URM4412, têm comportamento diferenciado quanto à percentagem de germinação, área da colônia e produção de conídios;
- O Confidor foi o inseticida que melhor se adequou às linhagens de *M. anisopliae*, enquanto Quimióleo foi considerado muito tóxico;
- As linhagens URM4412 e URM3349 comportaram-se como patogênicas ao caruncho do caupi, sendo esta última a mais virulenta ao *C. maculatus*;
- As linhagens de *M. anisopliae* avaliadas no experimento foram altamente patogênicas ao caruncho do caupi, podendo ser indicadas em programas de controle biológico dessa praga;

## 6. ANEXOS

# Neotropical Entomology

Formerly Anais da Sociedade Entomológica do Brasil

## Submit an Article

### Submission of a New Paper Confirmation

CARLOS FERNANDO RODRIGUES GUARANÁ  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL

Dear Mr(s). CARLOS FERNANDO RODRIGUES GUARANÁ,

The paper entitled "Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* Driver, Milner & Trueman com Inseticidas Químicos Utilizados para o Controle do *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae)." has been successfully sent to the Editorial Office of Neotropical Entomology. The following files were attached to your form:

| Description            | File                       |
|------------------------|----------------------------|
| artigo compatibilidade | Artigo compatibilidade.doc |

Soon you will be contacted by our staff and receive you article registration number.

Yours,

Regina Lucia Sugayama  
Editor-in-chief

### Submissão de Novo Trabalho Confirmação

CARLOS FERNANDO RODRIGUES GUARANÁ  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL

Caro Sr(a). CARLOS FERNANDO RODRIGUES GUARANÁ,

O trabalho intitulado "Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* Driver, Milner & Trueman com Inseticidas Químicos Utilizados para o Controle do *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae)." foi enviado com sucesso ao Editorial da Neotropical Entomology. Os seguintes arquivos foram anexados ao seu trabalho:

| Descrição              | Arquivo                    |
|------------------------|----------------------------|
| artigo compatibilidade | Artigo compatibilidade.doc |

Brevemente você será contactado por nossa equipe e receberá o código de seu trabalho.

Atenciosamente,

Regina Lucia Sugayama  
Editora Chefe

# Neotropical Entomology

ISSN 1519-556X *printed version*

ISSN 1678-8052 *online version*

## Política editorial

**Escopo.** A Neotropical Entomology publica artigos originais e que representem contribuição significativa para o conhecimento da Entomologia, desde que não estejam publicados ou submetidos a outra revista. Os artigos devem ter caráter científico. Trabalhos de cunho tecnológico como aqueles envolvendo bioensaios de eficiência de métodos de controle de insetos e ácaros de interesse agrícola, médico, veterinário ou florestal não são considerados para publicação. Os manuscritos são analisados por revisores *ad hoc* e a decisão de aceite para publicação pauta-se nas recomendações dos editores adjuntos e revisores *ad hoc*.

**Seções.** “Controle Biológico”, “Ecologia, Comportamento e Bionomia”, “Sistemática, Morfologia e Fisiologia”, “Proteção de Plantas” e “Saúde Pública”.

**Idiomas.** Os manuscritos devem estar preferencialmente em inglês, mas são considerados também artigos em português ou espanhol.

**Formatos aceitos.** São publicados artigos científicos completos, comunicações científicas e revisões (Fórum).

**Submissão.** Deve ser feita apenas por meio eletrônico através do formulário apropriado, disponível em [www.seb.org.br/neotropical](http://www.seb.org.br/neotropical)

## Forma e preparação do manuscrito

Utilize editor de texto Word 97 ou superior, página A4, com margens de 2,5 cm e linhas e páginas numeradas seqüencialmente ao longo de todo o documento. Utilize fonte Times New Roman tamanho 12 e espaçamento duplo.

**Página de rosto.** No canto superior direito, deve conter o nome completo e endereço (postal e eletrônico) do autor responsável pelo artigo. O título do artigo deve aparecer no centro da página, com iniciais maiúsculas (exceto preposições e artigos). Nomes científicos no título devem ser seguidos pelo nome do classificador (sem o ano) e pela ordem e família entre parênteses. Abaixo do título e também centralizado, listar os nomes dos autores em maiúsculas pequenas (versalete), usando apenas o primeiro nome e o sobrenome de cada autor por extenso. A seguir, liste as instituições dos autores, com endereço postal e endereço eletrônico, com chamada numérica, quando houver mais de um endereço. Esta página será suprimida pelo Editor

Adjunto ao enviar o arquivo eletrônico para os revisores ad hoc, resguardando-se a identidade dos autores.

**Página 2.** Título do artigo.

**Página 3. Resumo em idioma alternativo.** Artigo em Inglês: Resumo em Português ou Espanhol. Artigo em Português ou Espanhol: Abstract em Inglês. Incluir o título Instruções aos Autores traduzido, que deve ser grafado com letras minúsculas com apenas as iniciais maiúsculas (exceto preposições, conjunções e artigos). A seguir, escreva RESUMO, RESUMEN ou ABSTRACT, seguido de hífen, continuando com o texto em parágrafo único e, no máximo, 250 palavras. Pule uma linha e mencione o termo PALAVRAS-CHAVE, PALABRAS-CLAVE ou KEY WORDS em maiúsculas. Use de três a cinco termos separados por vírgulas e diferentes das palavras que aparecem no título do trabalho.

**Página 4.** Resumo no idioma do artigo. A página 4 deve trazer o resumo no mesmo idioma do artigo, sem o título. Os conteúdos do Resumo e do Abstract devem ser exatamente iguais. Siga as instruções para elaboração do segundo resumo (item anterior).

**Introdução.** Inicia na página 5, sem incluir o subtítulo “Introdução”. Deve contextualizar claramente o problema investigado e trazer a hipótese científica que está sendo testada, bem como os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos.** Centralize o subtítulo “Material e Métodos” com letras em negrito. Apresente informações suficientes para que o trabalho possa ser repetido. Inclua o delineamento estatístico e, se for o caso, o nome do programa utilizado para as análises.

**Resultados e Discussão.** Centralize o subtítulo “Resultados e Discussão” ou os subtítulos “Resultados” e “Discussão”, com letras em negrito. As conclusões devem estar contidas no texto final da discussão.

**Agradecimentos.** O subtítulo deve estar em negrito e centralizado. O texto deve ser breve, iniciando pelos agradecimentos a pessoas e depois a instituições ou agências de fomento.

**Referências.** Iniciar a lista de referências em uma nova página, sob o título **Referências**, dispondo-as em ordem alfabética, usando apenas as iniciais do(s) nome(s) do(s) autor(es) maiúsculas, seguido do ano da referência. Cite apenas o número do volume (sem o número do fascículo). Use vírgulas para separar os nomes dos autores. Cite o primeiro autor pelo sobrenome seguido das iniciais dos nomes. Do segundo autor em diante, use primeiro as iniciais do nome e após o sobrenome por extenso. Use o símbolo “&” antes de citar o último autor. Abrevie os títulos das fontes bibliográficas, sempre iniciando com letras maiúsculas. Utilize as abreviaturas de periódicos de acordo com o BIOSIS Serial Sources (<http://csssrvr.entnem.ufl.edu/~pmc/>)

[journals/all\\_journals.htm](http://journals/all_journals.htm) ou <http://www.library.uq.edu.au/faqs/endnote/biosciences.txt>). Os títulos nacionais deverão ser abreviados conforme indicado no respectivo periódico. Evite citar dissertações, teses, revistas de divulgação. Não cite documentos de circulação restrita (boletins internos, relatórios de pesquisa, etc), monografias, pesquisa em andamento e resumos de encontros científicos. Exemplos de citação de artigo, livro, capítulo de livro e página de internet estão disponíveis no site da revista.

**Tabelas.** Devem ser elaboradas em Word 97 ou superior, incluindo o título. Devem ser inseridas no texto após as Referências. Coloque uma tabela por página, numerada com algarismo arábico seguido de ponto final. As notas de rodapé devem ter chamada numérica. Por exemplo: Table 1. Mean ( $\pm$  SE) duration and survivorship of larvae and pupae of *T. absoluta* fed on leaves of different tomato genotypes. Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH: 70% and photophase: 14h.

**Figuras.** Após as tabelas, coloque a lista de legendas das figuras. Use a abreviação Fig.. As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas com segundo o número da figura. Exemplos: fig1.gif, fig2.jpg.

Fig. 1. Flutuação populacional de *M. fimbriolata* em São Carlos, SP, 2002 a 2005.

### Citações no texto

**Nomes científicos:** Escreva o(s) nome(s) científico(s) por extenso, seguido do autor descritor, quando mencionados pela primeira vez no Resumo, Abstract e na Introdução.

Ex.: *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). No restante do trabalho e nas legendas das figuras e cabeçalhos das tabelas, use o nome genérico abreviado. Ex.: *S. frugiperda*.

**Fontes de consulta:** As referências no texto devem ser mencionadas com o sobrenome do autor, com a inicial maiúscula seguido pelo ano da publicação (ex.: Martins 1998). No caso de mais de uma publicação, ordená-las pelo ano de publicação (ex.: Martins 1998, Garcia 2002, Gomes 2005). Para dois autores, use o símbolo "&" (ex.: Martins & Gomes 2004). Para mais de dois autores, utilize "*et al.*" (em itálico) (ex.: Garcia *et al.* 2003); para duas ou mais citações do mesmo autor, use ponto e vírgula entre os autores (ex.: Garcia 2003; Toledo 2001, 2005).

**Tabelas:** No texto, use a palavra por extenso (ex.: Tabela 1).

**Figuras:** No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3).

**Comunicações científicas.** Registros de ocorrência e de interações tróficas e novos métodos para estudo de insetos são considerados para publicação como comunicação científica. As instruções são as mesmas dos artigos completos. Entretanto, a Introdução, Material e Métodos e Resultados e Discussão devem ser escritos em texto corrido, sem subtítulos. O resumo deve ter até 100 palavras.

**Revisões (Fórum).** Revisões extensivas ou artigos sobre tópicos atuais em Entomologia são publicados nesta seção. Artigos controversos são bem-vindos, porém o texto deve explicitar as opiniões controvertidas e referir a versão comumente aceita. A Neotropical Entomology e seu Corpo Editorial não se responsabilizam pelas opiniões emitidas nesta seção.

Taxas de impressão. **Será cobrada a taxa de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) por página impressa para sócios da SEB com anuidade em dia e R\$ 35,00 (trinta e cinco reais) para não sócios.** Figuras coloridas devem ser inseridas quando estritamente necessárias e serão cobrados R\$ 80,00 (oitenta reais) adicionais por página colorida. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para consulta e *download* gratuitos no site da revista e da Scielo ([www.scielo.br/ne](http://www.scielo.br/ne)).

**Informações:** Regina Lúcia Sugayama/ Editora Chefe  
Caixa postal 441 – CEP 95.200-000  
Vacaria – RS – Brasil  
Fone: 55 54 232 4938 Fax: 55 54 232 0101  
[regina.sugayama@neotrop.entomol.com.br](mailto:regina.sugayama@neotrop.entomol.com.br)  
[www.seb.org.br/neotropical](http://www.seb.org.br/neotropical)