



Francisco Braga da Paz Júnior

**AÇÃO PATOGÊNICA DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* SOBRE
Callosobruchus maculatus (COLEOPTERA: BRUCHIDAE), ANÁLISE
GENÉTICA (PCR) E COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS
QUÍMICOS.**

Recife - PE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS – NÍVEL DOUTORADO

Francisco Braga da Paz Júnior

AÇÃO PATOGÊNICA DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* SOBRE
***Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE), ANÁLISE**
GENÉTICA (PCR) E COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS
QUÍMICOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Co - Orientadora: Profª. Dra. Elza Áurea de Luna-Alves Lima

Recife, PE.

2006

PAZ JÚNIOR, Francisco Braga da

Ação patogênica de linhagens de *Beauveria bassiana* sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), análise genética (PCR) e compatibilidade com inseticidas químicos / Francisco Braga da Paz Júnior. – Recife: O Autor, 2007.

xiv, 144p.: il.

Tese (Doutorado em Biologia de Fungos - Microbiologia) – UFPE. CCB

1. Controle microbiano 2. *Beauveria bassiana* 3. Inseticidas 4. *Vigna unguiculata*. 5. Coleoptera I. Título

595.76

CDU (2ª. Ed.)

UFPE

595.76

CDD (22ª. Ed.)


CCB – 2007 – 142

**AÇÃO PATOGÊNICA DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* SOBRE
Callosobruchus maculatus (COLEOPTERA: BRUCHIDAE), ANÁLISE
GENÉTICA (PCR) E COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS
QUÍMICOS.**

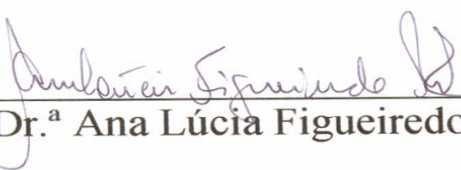
Francisco Braga da Paz Júnior

COMISSÃO EXAMINADORA


Membros Titulares



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (UMC/SP) **(orientador)**



Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE)



Prof.ª Dr.ª Cristina Maria de Souza Motta (UFPE)



Prof. Dr. Ricardo Yara (UFPE)



Prof. Dra. Janete Magali de Araújo (UFPE)

**“Os sonhos precisam de persistência
e coragem para serem realizados.
Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades.
Quando lutamos por eles,
nem sempre as pessoas que nos rodeiam,
nos apóiam e nos compreendem.
Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias,
tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos.
Mas os sonhos,
por serem verdadeiros projetos de vida,
resgatam nosso prazer de vida,
que representam a felicidade essencial que todos procuramos.”**

(Augusto Cury, 2004)

Ao meu filho, **Matheus**, que com sorrisos e beijos, renovava a cada dia as minhas esperanças de um mundo melhor e me dava forças para seguir em frente;

A minha **esposa Eliana**;

Aos meus **pais** (*in memoriam* minha mãe);

Aos meus **irmãos** para que este trabalho possa servir de inspiração e incentivo na caminhada por uma vida melhor;

Aos meus **avôs, tios e tias, primos e primos**;

Ao meu sobrinho **Gabriel**;

A minha sogra **Nidala**.

Ofereço

A **Deus**, por sempre me dar forças para continuar.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em todas as etapas da minha vida;

A Universidade Federal de Pernambuco, pela contribuição, incentivo e apoio a minha formação profissional, possibilitando a conclusão de meu curso de especialização, mestrado e doutorado;

A chefe do Departamento Micologia, Profa. Dra. Elza Áurea de Luna-Alves Lima que facilitou o desenvolvimento de minha pesquisa;

A coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelo apoio e compreensão diante as dificuldades enfrentadas na realização desta pesquisa;

A Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela paciência, orientação, confiança, apoio e compreensão dispensadas a minha pessoa em todo o decorrer da pesquisa;

A Prof. Dra. Elza Áurea de Luna-Alves Lima, minha co-orientadora, uma pessoa generosa, compreensiva, às vezes explosiva, que eu admiro, respeito, tenho muito afeto e cujos ensinamentos foram essenciais para a finalização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Francisco Cordeiro, *in memoriam*, uma pessoa amiga, atenciosa e prestativa. Que Deus o guarde;

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

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

A todos os professores do Departamento de Micologia, pelos ensinamentos e amizade ao longo desta pesquisa;

A minha esposa, Eliana Lyra, que esteve comigo em todos os momentos, desde os mais agradáveis aos mais desagradáveis, durante todo o decorrer desta pesquisa e, também, pelo presente que ela me deu: o de ser pai;

A Universidade Federal do Piauí pelo apoio e incentivo a minha formação profissional. Instituição onde fiz amigos e conclui meu curso de graduação em Ciências Biológicas, modalidade licenciatura;

A professora Iranise Batista Bezerra Torres, da Universidade Federal do Piauí, a quem muito estimo, admiro, respeito e tenho como parte de minha família;

A todos os professores do Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Biologia da UFPI, cujos ensinamentos e amizade foram essenciais para realização desse curso;

Ao Prof. José Luiz de Ribamar da Universidade Federal do Piauí pela força e incentivo na minha graduação, tornando-se um amigo valioso e muito querido;

Ao Prof. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná, companheiro de luta no doutorado, pelo apoio, prontidão e amizade demonstrados no decorrer da pesquisa;

A Prof. Dra. Bereneuza Brasileiro pela ajuda em momentos importantes da realização desta pesquisa;

Aos professores do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco - Uned Pesqueira pela convivência harmoniosa e alegre durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Pesquisador Clécio Queiroz, do IPA, um amigo oriundo do sufoco e dificuldades enfrentados durante o IV Curso de Especialização em Micologia. Um amigo de todas as horas;

Ao pesquisador Venézio do IPA, pela grande ajuda nas análises estatísticas em minha pesquisa;

A banca examinadora, pelas sugestões e críticas que abrilhantaram ainda mais a minha pesquisa;

E a todos aqueles que contribuíram, do seu modo, para o sucesso do meu curso de doutoramento em Biologia de Fungos, muito obrigado!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Feijão caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) e sua importância para o homem	18
2.2 Caracterização e biologia de <i>Callosobruchus maculatus</i>	19
2.3 Controle biológico de insetos por <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	21
2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)	26
2.5 Compatibilidade com produtos químicos	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	31
Capítulo I – AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. PARA O CONTROLE DO CARUNCHO <i>Callosobruchus maculatus</i> (F.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM GRÃOS DE CAUPI	45
Abstract	47
Resumo	48
1. Introdução	49
2. Material & Métodos	51
2.1 Linhagens fúngicas	51
2.2 Obtenção e criação dos insetos	51
2.3 Teste de patogenicidade	52
2.4 Reisolamento dos entomopatógenos	53
2.5 Análise estatística	53
3. Resultados & Discussão	54
4. Referencias	59
Capítulo II - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> COM BASE EM MARCADORES PCR	63
RESUMO	65

1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Linhagens fúngicas	68
2.2 Obtenção do micélio para extração do DNA genômico	68
2.3 Extração de DNA genômico	69
2.4 Quantificação do DNA genômico e revelação dos géis	70
2.5 Amplificação do DNA genômico	70
2.6 Amplificação dos ISSR	71
2.7 Análise computacional dos dados	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1 Análise das regiões de ISSR - (GTG)₅ e (GACA)₄	73
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
Capítulo III – Compatibilidade do fungo <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo)	
Vuillemin com Inseticidas Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi	
<i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae)	82
ABSTRACT	85
RESUMO.....	86
Introdução	87
Material e Métodos	89
Linhagens fúngicas e inseticidas utilizados	89
Mensuração do crescimento micelial	90
Produção de conídios e análise de germinação	91
Toxicidade dos produtos químicos	91
Análise estatística	92
Resultados e Discussão	93
Agradecimentos	101
Referências	102
4. CONCLUSÕES GERAIS	107
ANEXOS	109

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Caruncho (<i>Callosobruchus maculatus</i>) na fase adulta	20
Figura 2. Ciclo reprodutivo de <i>Callosobruchus maculatus</i> . a) fêmeas ovopositando sobre os grãos; b) grão infestado com ovos; c) janela de emergência do adulto; d) inseto adulto saindo de dentro do grão; e) acasalamento (à esquerda, macho)	21
Figura 3. Características microscópicas de <i>Beauveria bassiana</i> : fiálides em ziguezague e conídios globosos	23
Figura 4. Inseto adulto (<i>C. maculatus</i>) infectado por <i>B. bassiana</i> (URM 2921) ..	24
Figura 5. Estágios da reação de PCR, resultando em amplificação das seqüências de DNA que possuem seqüências complementares aos primers utilizados. Apenas um ciclo está representado	27
Capítulo I - AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. PARA O CONTROLE DO CARUNCHO <i>Callosobruchus maculatus</i> (F.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM GRÃOS DE CAUPI .	
Figura 1. Percentual médio de mortalidade total de <i>C. maculatus</i> em função das linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> e do tempo após a inoculação nos insetos	58
Capítulo II – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> COM BASE NA PCR	
Figura 1. Perfil de amplificação de ISSR de linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> com o iniciador (GTG) ₅ . Na pista M, marcador molecular de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 7, encontram-se os DNA das linhagens 2916, 2921, 2923, 2926, 4544, 4551 e 4552, respectivamente..	73
Figura 2. Perfil de amplificação de ISSR de linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> com o iniciador (GACA) ₄ . Na pista M, marcador molecular de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 7, encontram-se os DNA das	

linhagens 2916, 2921, 2923, 2926, 4544, 4551 e 4552, respectivamente.	74
Figura 3. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil do marcador ISSR – iniciador (GTG) ₅ obtidos de sete linhagens de <i>Beauveria bassiana</i>	75
Figura 4. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil do marcador ISSR – iniciador (GACA) ₄ obtidos de sete linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> ..	76
Capítulo III – Compatibilidade do fungo <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin com Inseticidas Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae)	
Figura 1. Estimativas de crescimento das linhagens, independentemente do inseticida utilizado, em função do tempo	95

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. PARA O CONTROLE DO CARUNCHO *Callosobruchus maculatus* (F.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM GRÃOS DE CAUPI

Tabela 1. Procedência das linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas nos experimentos com <i>Callosobruchus maculatus</i>	51
Tabela 2. Percentual médio de mortalidade de <i>Callosobruchus maculatus</i> tratados em diferentes concentrações de <i>Beauveria bassiana</i>	55

Capítulo II - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* COM BASE NA PCR

Tabela 1. Procedência das amostras de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas no experimento.....	68
Tabela 2. Oligonucleotídeos inicializadores utilizados na amplificação do DNA das linhagens de <i>B. bassiana</i>	70

Capítulo III – Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin com Inseticidas Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae)

Tabela 1. Linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas no experimento	89
Tabela 2. Inseticidas químicos, registrados para a cultura do caupi, utilizados nos testes de compatibilidade com as linhagens fúngicas	90
Tabela 3. Comparação dos valores médios do crescimento micelial das linhagens de <i>B. bassiana</i> e tratamentos em intervalos de tempo	94
Tabela 4. Diâmetro (cm) médio das colônias de <i>B. bassiana</i> em meio de cultura contendo inseticidas nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para aplicação em campo	97
Tabela 5. Toxicidade e compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados em culturas de caupi para <i>Beauveria bassiana</i> em condições de laboratório	98

RESUMO

Foram analisadas sete linhagens de *Beauveria bassiana* quanto à patogenicidade sobre os insetos adultos de *Callosobruchus maculatus* utilizando as concentrações 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios.mL⁻¹, sendo a virulência determinada pelo percentual de mortalidade durante o período de nove dias. Todas as linhagens mostraram-se altamente patogênicas, provocando mortalidade superior a 50% da população de insetos já no terceiro dia após a inoculação. As linhagens URM2921, URM2923 e URM4544 comportaram-se como as mais agressivas ao inseto-alvo, sugerindo sua utilização em programas de controle biológico do caruncho do caupi. Quanto à análise genética, utilizou-se marcadores moleculares com base em PCR, sendo empregado o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) - iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ para investigar a diversidade genética de sete linhagens de *Beauveria bassiana*. Esses *primers* são usualmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. A análise genética revelou que os *primers* foram eficientes em demonstrar a variabilidade intraespecífica entre as linhagens de *B. bassiana*. Analizando o efeito fungitóxico, *in vitro*, de produtos fitossanitários utilizados em culturas de feijão sobre o crescimento vegetativo e conidiogênese das linhagens de *B. bassiana*, observou-se que independente do inseticida utilizado, as linhagens URM2923, URM2926 e URM4552 apresentaram as maiores médias de crescimento micelial, enquanto a linhagem URM4544 apresentou o menor diâmetro. A compatibilidade das linhagens de *B. bassiana* variou amplamente dentro de cada linhagem e entre os inseticidas estudados, sendo Quimióleo (óleo vegetal) o produto que apresentou o maior efeito fungitóxico e URM2921 a linhagem mais sensível ao efeito dos defensivos agrícolas. As demais linhagens, dependendo do inseticida, podem ser recomendadas para programas de Manejo Integrado de Pragas do feijoeiro.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, controle microbiano, PCR, microsatélite, inseticidas, compatibilidade, *Vigna unguiculata*, caupi.

ABSTRACT

Seven strains of *Beauveria bassiana* were analysed as the pathogenicity on adult insects of *Callosobruchus maculatus* had been analyzed using concentrations 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4 conídios.mL⁻¹, being the virulence determined for the percentage of mortality during the period de nine days. All the strains had revealed highly pathogenic, causin superior mortality 50% of the population of insects no longer third day after the inoculation. The strains URM2921, URM2923 and URM4544 had behaved as the most aggressive to the insect-target, suggesting its use in programs of biological control of caruncho of caupi. As the analyzes genetics, used marking molecular on the basis of PCR, being used ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) - initiating (GACA)₄ e (GTG)₅ to investigate the genetic diversity of seven strains of *B. bassiana*. These primers usually are used for amplification of repeated Inter-regions. The genetic analysis disclosed that the *primers* had been efficient in demonstrate the variable intraspecific diversity between the strains of *B. bassiana*. Analyzing the fungitoxic effect , *in vitro*, of pesticides products used in beans cultures on the vegetative growth and conidiogenesis of the strains of *B. bassiana*, was observed that independent of the used insecticide, the strains URM2923, URM2926 and URM4552 had had presented average greater mycelial growth, while strains URM4544 presented the lesser mycelial diameter. The compatibility of the strains of *B. bassiana* varied widely inside of each strain and between the studied insecticides, being Quimióleo (vegetal oil) the product that presented biggest fungitoxic effect and URM2921 the strain most sensible to the effect of the agricultural defensives. The too much strains, depending on the insecticide, can be recommended for Integrated Pest Management programs of the feijoeiro.

Key-words: *Beauveria bassiana*, microbial control, PCR, microsatellit, insecticides, compatibility, *Vigna unguiculata*, cowpea.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão de corda, macassar ou caupi) é uma das principais na Região Norte e Nordeste do Brasil, sendo praticada, principalmente por pequenos e médios agricultores, devido a sua importância como cultura de subsistência (MORAES; RAMALHO, 1980; MAGALHÃES; SILVA, 1981; BARTOLI; VAZ FILHO, 1987; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2000). Para a população brasileira o feijão é um dos principais alimentos, constituindo importante fonte de proteína, calorias e outros nutrientes para a dieta, podendo ser uma ajuda no combate à subnutrição e à desnutrição dos brasileiros (FAGÉRIA *et al.*, 2006).

O Brasil é o maior produtor com uma produção anual na ordem de dois milhões de toneladas, o que equivale a cerca de 20% da produção mundial de feijão (ARAGÃO *et al.*, 1998; TOMÉ *et al.*, 2001). Segundo STONEL; SARTORATO (1994) a estimativa na ordem de 30% das perdas da produção total do feijão no Brasil ocorre devido ao ataque de pragas durante o armazenamento.

A maioria das pragas do feijoeiro estão na classe Insecta, que conta com mais de quinze espécies de importância econômica, com ampla distribuição geográfica no País. Esses organismos, se não forem combatidos, proliferam e, através de sua atividade fisiológica, aumentam o teor de umidade e temperatura dos grãos, propiciando o desenvolvimento de fungos, que contribuem para a deterioração dos mesmos. Os danos causados por esses insetos nocivos ao feijão são grandes, depreciando-os qualitativamente e quantitativamente (PEREIRA, 1986; VIEIRA, 1988).

No Nordeste, o caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1977) (Coleoptera: Bruchidae), destaca-se como a principal praga, pela sua importância devido ao prejuízo que causa ao caupi. A infestação inicia no campo e intensifica-se no armazém. Os prejuízos causados pelos carunchos em feijoeiro traduzem-se em apreciáveis alterações no peso, tipo de grãos, danos indiretos (que facilitam a entrada de microrganismos ou de ácaros), aquecimento da massa de grãos, perdas em seu peso e em seu valor nutritivo (ATHIÉ; DE PAULA, 2002), sendo depreciados comercialmente.

O uso de inseticidas para o controle de pragas tem aumentado os custos da produção. Além disso, produz efeitos tóxicos ao meio ambiente e a saúde dos humanos,

provocam a destruição dos inimigos naturais e o desenvolvimento de insetos resistentes. Em consequência disso, o controle biológico assume papel cada vez mais importante no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (BALDIN, 2001; ALVES *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2004).

A importância dos microrganismos entomopatogênicos no controle de insetos pragas está cada vez mais evidente. Dentre os entomopatogênicos, merece destaque o fungo *Beauveria bassiana*, que vem sendo estudado com resultados promissores. A eficácia deste fungo tem se consolidado em pragas de grãos armazenados, tais como o gorgulho do arroz e do milho (ODUOR *et al.*, 2000; DAL BELLO *et al.*, 2001; PADIN *et al.*, 2002), o caruncho do feijão (MOINO JÚNIOR, 1993; CHERRY *et al.*, 2004), entre outros.

Para o MIP, é importante a seleção do entomopatógeno, de acordo com suas características e aquelas da cultura onde os mesmos serão utilizados (PEREIRA *et al.*, 2002). A interação entre defensivos agrícolas e *B. bassiana* tem recebido atenção especial de vários pesquisadores, os quais observaram interações positivas deste fungo quando associados a diferentes produtos químicos (BATISTA FILHO *et al.*, 2001; DAL BELLO *et al.*, 2001; NEVES *et al.*, 2001; MOURÃO *et al.*, 2003; ANDALÓ *et al.*, 2004).

Vários métodos para identificação de fungos entomopatogênicos são baseados na morfologia dos esporos, características bioquímicas e propriedades imunológicas, entretanto diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética. A técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem sido intensamente investigada para detecção, identificação e análise filogenética de muitas espécies fúngicas (DESTÉFANO *et al.*, 2004). Dentre as técnicas de marcadores disponíveis, pode ser destacada a de microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), em que segmentos de sequência repetida, distribuídos aleatoriamente no genoma, são amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos (PADILHA *et al.*, 2003). Por ser uma técnica caracterizada pela simplicidade, rapidez e alto polimorfismo, tem sido bastante usada na análise inter e intraespecífica de grupos de linhagens fúngicas (BRASILEIRO *et al.*, 2004.)

A escolha de estratégias, formulações e tecnologia de aplicações adequadas, e o uso de melhoramento genético dos entomopatógenos e da interação de diversas práticas culturais que beneficiem a ação dos patógenos são procedimentos indispensáveis para a otimização de *B. bassiana* dentro do MIP.

O presente trabalho teve por objetivo analisar a ação patogênica, a variabilidade genética utilizando os marcadores moleculares ISSR - iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ e o efeito da interação de linhagens de *B. bassiana* com inseticidas químicos registrados para a cultura do caupi, visando o controle do caruncho *Callosobruchus maculatus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijão caupi (*Vigna unguiculata*) e sua importância para o homem.

O caupi é uma Dicotiledônea que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboidae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina, gênero *Vigna* e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (SILVA; FREIRE FILHO, 1999).

No Brasil é conhecido como feijão regional, feijão de corda ou macassar, constitui-se num alimento básico da população brasileira, sendo a sua principal fonte de proteína vegetal (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2000). Segundo FAGÉRIA *et al.* (2006) os grãos de feijão representam uma importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, particularmente nas Américas (47% da produção mundial) e no leste e sul da África (10% da produção mundial). O Brasil é o maior produtor, com uma produção anual na ordem de dois milhões de toneladas, o que equivale a cerca de 20% da produção mundial. O consumo anual per capita é de 14 quilogramas. O teor de proteína das sementes varia de 20 a 33%, sendo também um alimento energético, contendo cerca de 340cal/100g (ARAGÃO *et al.*, 1998; TOMÉ *et al.*, 2001). Estima-se um aumento de 2,6% na produção anual para o período 2006 a 2014. Sua produção deverá passar de 2,91 milhões para 3,67 milhões de toneladas nesse mesmo período, o que equivale a um aumento de 763,4 mil toneladas (CONTINIO *et al.*, 2005).

O caupi desempenha um papel social muito importante junto à população mais pobre, principalmente na alimentação, por ser dotada de alto teor protéico, apresentar todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) e não conter colesterol (ANDRADE JÚNIOR *et al.* 2005). Esta leguminosa possui vários subprodutos, dentre os quais, grãos e vagens verdes, e grãos secos. Suas folhas e ramos podem ser utilizados como complemento na alimentação animal. É uma planta com elevada capacidade de fixar nitrogênio, através da simbiose com bactérias nodulantes do gênero *Rhizobium* (FERREIRA *et al.*, 2000) e

Bradyrhizobium, podendo ser utilizado tanto na proteção e conservação dos solos contra a erosão quanto na melhoria das características físicas, químicas e biológicas dos solos que possuem baixa fertilidade (WUTKE *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado o potencial antioxidante de variedades de caupi (SIDDHURAJU & BECKER, 2007). Devido a esta propriedade, as sementes podem ser usadas como suplemento alimentar na prevenção e tratamento de doenças como o câncer (GE *et al.*, 2006); arteriosclerose (GONZALEZ-SANTIAGO *et al.*, 2006) e possivelmente em outras desordens neurodegenerativas (GUEVEN *et al.*, 2006).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2004 a safra total do feijão ocupou uma área de 4.378,70 mil hectares, produzindo mais de três milhões de toneladas. De acordo com STONEL & SARTORATO (1994), as estimativas das perdas da produção total do feijão no Brasil devido ao ataque dos insetos no armazenamento, giram em torno dos 30%.

2.2 Caracterização e biologia de *Callosobruchus maculatus*

Normalmente as pragas que ocorrem por ocasião do armazenamento provêm do campo, a isto é o que se chama de infestação cruzada. A infestação pode ser feita por meio de ovos, larvas ou adultos, que juntamente com as vagens, grãos ou sacarias, chegam aos armazéns, infestando também os grãos já existentes. Por outro lado, grãos sadios provenientes do campo podem ser infestados nos armazéns quando medidas preventivas não são tomadas. Portanto, a contaminação inicial pode ocorrer tanto no campo quanto nos armazéns. Dentre as principais pragas que atacam o caupi em condições de armazenamento, cita-se o caruncho do feijão, também conhecido por gorgulho ou bicho-do-feijão (ANDRADE JÚNIOR, 2005; VIEIRA, 1988). O seu ataque inicia-se antes da colheita e intensifica-se no produto armazenado, chegando a provocar perdas totais (ARRUDA; BATISTA 1998).

Os insetos adultos medem de 3,0-4,5 mm de comprimento, possuem corpo ovalado, cabeça livre, defletida sob o protórax, rostro curto e achatado; antenas levemente serreadas com onze segmentos. As fêmeas apresentam élitros frequentemente com duas manchas grandes na margem mediana e manchas menores nas extremidades anteriores e posteriores, com uma área castanho-acizentado em forma de “X” cobrindo o restante do corpo (Figura 1). O macho é menor e possui manchas menos distintas (ATHIÉ; DE PAULA, 2002).



Figura 1. Caruncho (*Callosobruchus maculatus*) na fase adulta.

Os ovos são brancos e ovóides. Estes ficam aderidos ao substrato onde são colocados. As fêmeas ovopositam, em média setenta ovos, sobre ou entre vagens e grãos expostos. Os adultos apresentam-se na proporção de uma fêmea para um macho e tem 7 a 9 dias de longevidade (GALLO *et al.* 2002). Do ovo nasce uma larva provida de patas, que logo penetra nos grãos por meio do tegumento e formam uma câmara consumindo o cotilédone. Alimenta-se continuamente durante o período larval e, no final do último *ínstar*, as pupas com as mandíbulas são direcionadas a janela da saída do adulto. O adulto pode permanecer por vários dias dentro dessas câmaras antes de empurrarem a janela com a cabeça e as pernas, emergindo para acasalar e recomeçar o ciclo reprodutivo (Figura 2) (WHIGTMAN; SOUTHGATE, 1982). Num só grão de feijão podem viver diversas larvas que o destroem completamente (VIEIRA, 1988).

Os danos causados pelo caruncho do feijão são consideráveis, depreciando-os qualitativa e quantitativamente. Os prejuízos são avaliados pela redução do peso, na qualidade do produto, na queda do poder germinativo das sementes, além da desvalorização comercial devido à presença dos insetos e ovos, (STONEL; SARTORATO, 1994), sabor desagradável e mau aspecto comercial (VIEIRA, 1988). O risco de infestação pelo inseto inibe as iniciativas de estocagem, tanto de grãos, no mercado atacadista, quanto de sementes, o que acentua a instabilidade de preços e restringe a possibilidade de incrementos produtivos da cultura via difusão de cultivares melhoradas (BARRETO; QUINDERÉ, 2000).

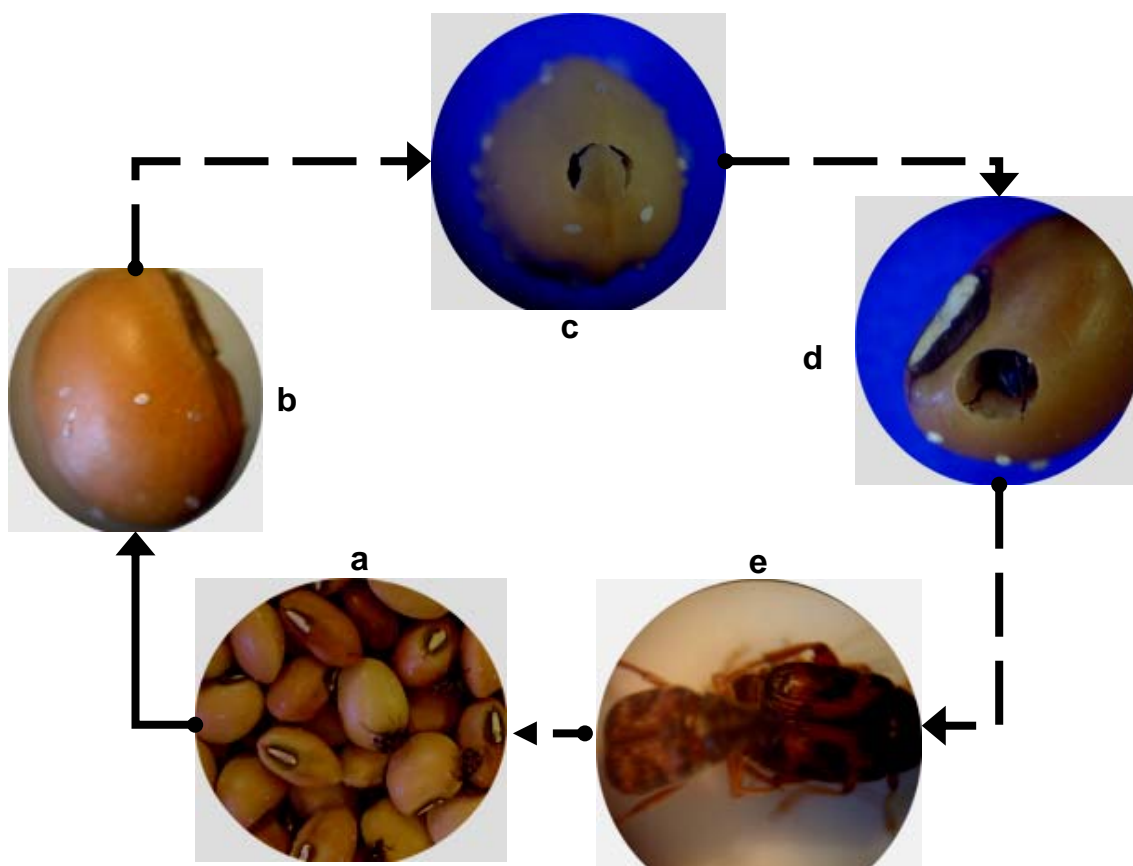


Figura 2. Ciclo reprodutivo de *Callosobruchus maculatus*. a) fêmeas ovopositando sobre os grãos; b) grãos infestados com ovos; c) janela de emergência do adulto; d) inseto adulto saindo de dentro do grão; e) acasalamento (à esquerda, macho).

2.3 Controle biológico de insetos por *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

O controle biológico é um fenômeno que consiste na regulação do número de pragas por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica (PARRA *et al.*, 2002). Atualmente, o controle biológico assume importância cada vez maior no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Além disso, é importante como medida de controle para manutenção das pragas abaixo do nível de dano econômico, junto a outros métodos, como o físico (MBATA *et al.*, 2000), o de resistência de plantas a insetos (MACEDO *et al.*, 2002a, b) que pode até ser integrados de forma positiva com métodos químicos (ALMEIDA *et al.*, 1998).

O método de controle mais empregado contra os carunchos é o químico (inseticidas). Esse fato decorre da tradição do uso desses produtos junto aos produtores, facilidade de aplicação e disponibilidade de equipamentos e serviços no mercado (TAMAI *et al.*, 2002). Embora o controle químico dessa praga possa ser feito com eficiência, as condições de armazenamento disponíveis da maioria dos agricultores permitem reinfestações (ARRUDA; BATISTA 1998). Além disso, o uso intensivo e indiscriminado desses produtos favorece o surgimento de pragas secundárias, deixam resíduos (MARQUES *et al.*, 2004), elevam os custos da produção, são altamente tóxicos, sendo prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (BALDIN, 2001) como também acarretam diminuição do potencial de controle efetuado por predadores, parasitóides e patógenos (ALVES *et al.*, 2002).

Os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos fitófagos, aquáticos e pragas do solo, além de causar epizootias naturais. Têm grande versatilidade e podem infectar diferentes estágios do ciclo biológico do hospedeiro, como ovos, larvas, pupas e adultos (ONOFRE *et al.*, 2002). Alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem em relação aos outros grupos de patógenos (bactérias, protozoários e vírus) que penetram no inseto por via oral ou do mesêntero (ALVES, 1998).

A espécie *Beauveria bassiana* foi primeiramente descrita pelo entomologista italiano Agostino Bassi, em 1835, como o agente etiológico do *mal del segno*, também conhecida como *calcinaccio* or *cannellino* na Itália e *muscardino* branco na França. Esse microrganismo atacava e matava as larvas do bicho-da-seda. A primeira descrição taxonômica do fungo muscardino foi proposta por Giusepp Balsamo-Crivelli, que em homenagem a descoberta de Bassi, nomeou o patógeno de *Botrytis bassiana* (Balsamo-Crivelli, 1835). Posteriormente, esse fungo recebeu outras denominações, entre elas *Sporotrichum densus*, *Beauveria densa*, *Sporotrichum globuliferum*, *Beauveria globulifera* e *Beauveria bassiana* (AINSWORTH, 1973).

O gênero *Beauveria*, propriamente dito, só foi descrito em 1912 por Vuillemin que designou *Botrytis bassiana* Bals.-Criv. como Espécie-Tipo (Rehner; Buckley, 2005). Segundo Mugnai *et al.*, (1999), a partir de caracteres morfológicos e químicos, seis espécies foram identificadas: *B. Alba*, *B. Amorpha*, *B. Bassiana*, *B. Brogniartii*, *B. Velata* e *B. vermiconia*. A espécie *B. bassiana* caracteriza-se por apresentar fiálides em forma de frascos com a parte basal terminada em zigue-zague,

formando densos conídios globosos ou subglobosos, variando de 2 a 3 x 2 a 2,5µm (Figura 3)



Fonte: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>

Figura 3. Características microscópicas de *Beauveria bassiana*: fiálides em ziguezague e conídios globosos.

O emprego desses patógenos no controle de pragas de grãos armazenados não tem recebido muita atenção, provavelmente devido às condições ambientais hostis para sobrevivência e eficácia dos fungos entomopatogênicos. Entretanto, estudos na área têm encorajado novas pesquisas. Neste sentido, ODUOR *et al.*, (2000) relatou a ocorrência de *B. bassiana* em insetos pragas (*Sitophilus zeamais*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitotroga cerealella* e *Tribolium* spp.) em grãos de arroz armazenados. DAL BELLO *et al.*, (2001) e PADIN *et al.*, (2002) também avaliaram a virulência de isolados de *B. bassiana* sobre o gorgulho do arroz (*Sitophilus orizae* L.) em grãos armazenados. Já SMITH *et al.*, (2006) estudaram o efeito desse fungo sobre a broca do milho *Prostephanus truncatus*. O isolado fúngico apresentou excelentes resultados nos bioensaios em laboratórios, causando mortalidade de 100% nas primeiras duas semanas de tratamento.

A habilidade de *B. bassiana* de controlar pragas de grãos armazenados tem sido investigada principalmente no controle de insetos em arroz. Contudo, novas pesquisas para o controle de pragas de grãos em feijões têm surgido. CHERRY *et al.*

(2004) avaliaram o potencial de diferentes linhagens de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Callosobruchus maculatus*. Os autores constataram que o entomopatógeno reduziu significativamente a população do inseto nos grãos de caupi. MURRAD *et al.* 2006 também evidenciaram uma alta atividade letal contra o bruchideo nos bioensaios realizados com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

O ciclo das ralações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais (umidade, luz, temperatura, entre outros.), das condições nutricionais e susceptibilidade do hospedeiro e apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, penetração, colonização, morte do inseto, extrusão micelial e conidiogênese. Após aplicação, os conídios aderem-se ao corpo do inseto, produzindo tubos germinativos. Na extremidade do tubo germinativo ocorre uma dilatação das hifas, formando apressórios, os quais são observados durante a penetração pelo fungo. O fungo penetra a cutícula através da combinação da pressão hifal e atividade enzimática (Alves, 1998). A fase de colonização ocorre entre 72 e 120 horas. O inseto morto apresenta uma coloração rosada característica da atividade da oosporeína que é comum em insetos infectados por *B. bassiana* para depois assumir a coloração esbranquiçada decorrente do crescimento micelial. A extrusão micelial dos cadáveres ocorre principalmente nas áreas intersegmentais (Figura 4) (MOINO JÚNIOR *et al.*, 2002).



Figura 4. Inseto adulto (*C. maculatus*) infectado por *B. bassiana* (URM 2921).

A eficiência e especificidade de *B. bassiana* também têm sido avaliadas para o controle de insetos de interesse veterinário, os carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* (REIS *et al.*, 2001), *Anocentor nitens* (MONTEIRO *et al.*, 2003) e de vetores de doenças em humanos, tais como: a mosca *Chrysomya albiceps* (FEIJÓ, 2004), a mosca tse-tsé *Glossinia morsitan morsitans* (KAAYA; MUNYINYI, 1995), o barbeiro *Triatoma infestans* (LEUCUONA *et al.*, 2001; LUZ *et al.*, 1998; LUZ *et al.*, 2004) e dos mosquitos flebotomíneos transmissores da leishmaniose (REITHINGER *et al.*, 1997), entre outros.

Beauveria bassiana é comprovadamente patogênico para os insetos, provocando mortalidade em todas as fases de seu ciclo biológico. REIS *et al.* (2001, 2004) avaliaram a ação *in vitro* desse fungo sobre os estádios de ninfa e adultos do carrapato *Amblyomma cajennense*, observando diferenças significativas entre os tratamentos quanto à mortalidade para todos os isolados em todos os *instares*. MONTEIRO *et al.* (2003) observaram uma redução expressiva no número de larvas de ixodídeos da *A. nitens* no tratamento com esse mesmo fungo.

CÉSAR FILHO *et al.* (2002) avaliaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* sobre lagartas do curuquê-do-algodoeiro (*Alabama argilaceae*). Eles observaram a mortalidade de 80,7% e TL₅₀ variando entre 4,1-6,4 dias na concentração de 10⁸ conídios/mL. Isolados desse fungo provenientes de diferentes hospedeiros e localidades foram testados contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus*. As lagartas infectadas por *B. bassiana* apresentaram inicialmente coloração rósea e consistência de aspecto mumificado. Após a colonização do corpo dos insetos pela massa micelial, ocorreu a produção de conídios de coloração branca (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2002). Segundo SILVA (2001) a espécie do hospedeiro de origem e a região geográfica são fatores determinantes para obtenção de isolados com ampla variabilidade quanto ao grau de virulência.

SAMUELS *et al.* (2002) utilizaram várias linhagens de *B. bassiana* capazes de infectar ou controlar o estágio de ovos do ciclo de vida do *Blissus antilus*. ALVES *et al.* (2005) relataram a ocorrência natural desse fungo sobre larvas, pupas e adultos de cascudinho, *Alphitobius diaperinus*, em aviários comerciais de Cascavel no Paraná. Em todas as avaliações foram encontrados insetos infectados por *B. bassiana*, embora tenham sido coletados mais adultos do que larvas. Os autores também constataram que houve maior percentual de larvas infectadas em relação às pupas e aos adultos (74,4% e 40,7% de infecção para larvas e adultos).

A avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *B. bassiana* sobre uma mesma população de insetos tem demonstrado diferenças significativas quanto à virulência desses entomopatógenos (BARRETO *et al.*, 2001; SAMUELS; CORACINI *et al.*, 2004; ROHDE *et al.*, 2006). A grande variabilidade genética presente nesses fungos pode ser um dos principais fatores responsáveis pela diferença de virulência entre isolados e espécies (SILVA, 2001; MURO *et al.*, 2003).

2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

A PCR é uma técnica poderosa que envolve a síntese de enzimas *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da DNA polimerase. Essa ferramenta baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados com iniciadores (*primers*) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares à sequência específica que flanqueiam a região alvo (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996).

Uma reação de PCR típica apresenta os seguintes passos: (a) desnaturação, etapa onde o DNA é desnaturado, ou seja, aquecido a temperatura em torno de 95°C para que as fitas duplas de DNA sejam separadas gerando os moldes simples fitas; (b) anelamento, quando a temperatura da reação é diminuída até àquela onde os *primers* possam ser anelados (hibridizados) especificamente em suas regiões complementares nos molde de DNA de fita simples, e (c) extensão ou síntese, onde as regiões dupla de fita geradas pelo anelamento dos *primers* sejam utilizadas pela DNA polimerase para realizar a síntese de DNA a partir do molde fita simples (Figura 5). Repetindo esses passos de 30 a 50 vezes, ter-se-á como produto final uma grande quantidade de DNA de fita dupla contendo cópias das regiões de DNA entre os *primers* (SCHRANK; VAINSTEIN, 2002).

Até recentemente, o estudo da diversidade dos microrganismos era feito apenas com base em métodos que dependiam do isolamento e crescimento desses microrganismos em meio de cultura seguido da análise morfológica, fisiológica e/ou bioquímica. Atualmente, a avaliação da biodiversidade tem se baseado na obtenção de DNA e amplificação de sequências alvos utilizadas como marcadores (filogenéticos, funcionais e/ou estruturais). Essas moléculas amplificadas podem ser utilizadas para

gerar perfis eletroforéticos, matrizes para hibridização com sondas de oligonucleotídeos ou construção de bibliotecas para o sequenciamento (SANTOS *et al.* 2002).

Devido a sua especificidade e sensibilidade, a PCR se constitui em um método importante para o diagnóstico de fungos. Existem vários exemplos de teste baseados em PCR desenvolvidos para detecção de variabilidade genética de fungos fitopatógenos (WEIKERT-OLIVEIRA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; BRASILEIRO *et al.*, 2004), micorrízicos arbusculares (COLOZZI FILHO; CARDOSO, 2000), nematófagos (MAUCHLINE *et al.*, 2002) e causadores de doenças em humanos (DIEZ *et al.*, 1999; MACHOUART-DUBACH *et al.*, 2001), entre outros.

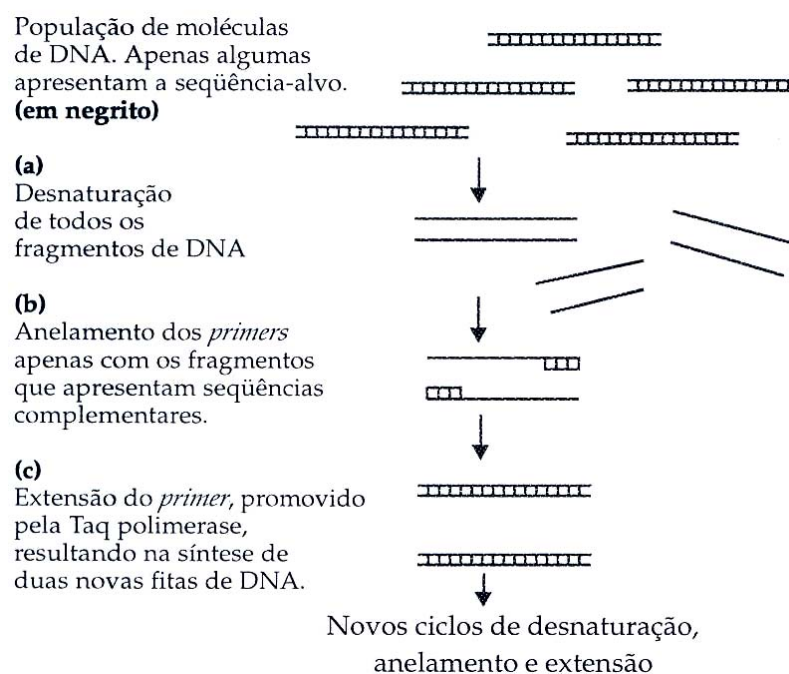


Figura 5. Estágios da reação de PCR, resultando em amplificação das sequências de DNA que possuem sequências complementares aos *primers* utilizados. Apenas um ciclo está representado. (Fonte: ROSATO *et al.*, 2002).

Com o rápido aperfeiçoamento das técnicas moleculares, fundamentadas na amplificação de fragmentos de DNA, grandes avanços têm sido alcançados na área dos marcadores de DNA. Dentre as técnicas de marcadores de DNA disponíveis, pode ser destacada a de microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), em que segmentos de sequência repetida, distribuídos aleatoriamente no genoma, são amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos (PADILHA *et al.*, 2004). Os microssatélites

consistem de pequenas seqüências com a 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* em um dado locus distribuídos ao longo do genoma. Cada loco é analisado individualmente ao se utilizar o par de *primers* construídos especificamente para sua amplificação (FERREIRA; GRTTAPAGLIA, 1996).

Além de possuírem elevado polimorfismo, os microssatélites são mais susceptíveis a mutações, não são afetados pelo DNA exógeno e podem, conseqüentemente, ser mais apropriado para análise de amostras de microrganismos (FENG *et al.*, 2000). Esta técnica caracteriza-se, ainda, pela simplicidade, alta reprodutibilidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, (BRETAGNE *et al.*, 1997).

Os iniciadores de microssatélites com motivos de (AT)_n, (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (TG)_n, (ACA)_n, (ACC)_n, (ACG)_n, (ACT)_n, (AGC)_n, (AGGCT)_n, (AGT)_n, (ATC)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n são geralmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. Esta ferramenta revela o polimorfismo de DNA na seqüência de nucleotídeos entre os dois sítios de microssatélites nos genomas fúngicos, gerando o perfil ISSR, Inter Simple Sequence Repeats (GUPTA *et al.*, 1994). A análise de regiões de SSR amplificados com o iniciador (GTG)₅ utilizando em linhagens de fungos entomopatogênicos mostrou-se bastante eficiente em detectar variabilidade intra e interespecífica entre os fungos estudados (LIMA, 2005; CARNEIRO-LEÃO, 2006).

Apesar do Brasil ser um país que se destaca pelos casos de sucesso de controle biológico clássico, ainda são poucas as informações existentes sobre a variedade genética de espécies de fungos entomopatogênicos isolados em nosso país. O conhecimento da variabilidade genética é de grande importância para realização de estudos genéticos e desenvolvimento de programas de melhoramento (FUNGARO, 2000), detecção de doenças genéticas em animais, análise de patógenos, animais e plantas, e na análise de microrganismos em alimentos (MARQUES *et al.*, 2002).

2.5 Compatibilidade com produtos químicos

A preocupação com os inseticidas de baixo impacto sobre os organismos foi por muitos anos negligenciada. Somente após desastrosos exemplos de desequilíbrio ambiental provocados pelo emprego abusivo e inadequado de controle químico é que a

comunidade científica despertou para a necessidade de adotar medidas de racionalização do uso de pesticidas na agricultura e avaliar seus efeitos sobre as populações de inimigos naturais (DEGRANDE *et al.*, 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 de produtos fitossanitários é, provavelmente, o principal fator que contribui para o aumento da população de pragas e a redução da produtividade, além dos efeitos indesejáveis dos mesmos sobre o ambiente, o homem e os animais de modo geral. A estratégia do controle associado ou integrado aos fungos entomopatogênicos surge como uma nova alternativa no controle biológico de insetos pragas. Entretanto, alguns desses produtos podem influenciar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação dos fungos, e até mesmo provocar alterações genéticas nesses entomopatógenos, alterando a sua virulência. Sendo assim, é necessário que se utilizem produtos seletivos que não afetem o equilíbrio entre as pragas e seus predadores, parasitos e patógenos. (ALVES *et al.*, 1998). Vários estudos têm demonstrado alterações no desenvolvimento de *B. bassiana*, sendo necessária precaução quando utilizado no manejo integrado de pragas e doenças, caso exista o uso conjunto com este fungo (ANDALÓ *et al.*, 2004).

Embora muitos agentes químicos possam interferir negativamente na ação dos entomopatógenos, alguns produtos químicos podem ser utilizados em associação com os produtos microbianos, por terem ação sinérgica ou aditiva com os mesmos. Esses procedimentos, além de reduzir o número de aplicações de produtos químicos pode melhorar o desempenho dos produtos microbianos. Além disso, os entomopatógenos têm a vantagem de persistir por mais tempo no ambiente do que os inseticidas químicos de ação rápida, agindo na manutenção das populações pragas a baixos níveis e minimizando ou evitando o ressurgimento de pragas (PEREIRA *et al.*, 1998).

Estudos do efeito fungitóxico *in vitro* das formulações químicas tem sido desenvolvidos expondo *B. bassiana* aos produtos fitossanitários. Na maioria dos casos, faz-se a análise da germinação, crescimento vegetativo e conidiogênese. Contudo, a viabilidade dos conídios deve ser considerada o parâmetro mais importante a ser avaliado no processo de infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Várias substâncias de uso na agricultura para o controle de pragas afetam negativamente *B. bassiana*, inibindo o crescimento micelial, a germinação e esporulação conidial. Entre elas, citam-se os biofertilizadores e o óleo de neem (HIROSE *et al.*, 2001), óxido cuproso, iprodione, paratiom metílico, tebuconazole, metalaxil, mancozebe, folepete, fenpropatrina e tetraconazole (LOUREIRO *et al.*, 2002), tiametoxan, ciflutrin, deltametrina, triazofos, alfa-cipermetrina, (OLIVEIRA *et al.*, 2003), tecobuconazole, paratiom metílico, clorpirifós-metílico (MOURÃO *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos demonstram a associação positiva de defensivos agrícolas com os fungos entomopatógenos. NEVES *et al.*, (2001) recomendam o uso dos inseticidas acetamipride (Saurus 200PS), imidaclopride (Confidor 700 GrDA) e tiametoxam (Actara 250 WG) em programas de MIP para o controle de pestes que tenham como inimigos naturais o *B. bassiana*. Da mesma forma, também são recomendados os inseticidas tiametoxam, imidaclopride (LOUREIRO *et al.*, 2002), alfacipermetrina (OLIVEIRA *et al.*, 2003), carbofuran, penicuron (ANDALÓ *et al.*, 2004), triadimenol, etiom e dissulfoton (MOURÃO *et al.*, 2003).

De maneira geral, os testes de toxicidade de pesticidas para os microorganismos benéficos, também denominados de seletividade, efeito adverso ou colateral, são conduzidos em laboratórios, por meio de bioensaios (DEGRANDE *et al.*, 2002). Os estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo os microrganismos à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores podem interferir nessa exposição, protegendo o entomopatógeno (ALVES *et al.*, 1998). DAL BELLO *et al.*, (2001) avaliaram a ação *in vitro* de diferentes fungos entomopatogênicos e obtiveram as melhores respostas com os isolados de *B. bassiana*. Os autores observaram que o controle integrado (*B. bassiana* ARSEF 5501 associado ao inseticida) apresentou uma maior mortalidade (80 %) que o uso do fungo ou do inseticida sozinho. Trabalhos desta natureza demonstram a necessidade de mais estudos sobre a compatibilidade do controle biológico com outras práticas como o uso de defensivos agrícolas.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, Á. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; ARIAS, C. A. A; CARVALHO, V. P; JACOUD FILHO, D. S.; MARIN, S. R. R.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; CARVALHO, C. G. P. Diversidade genética entre isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, avaliada por RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.279-285, 2003.

ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B.; MOINO JR, A.; LOPES, R. Controle de cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) com iscas termitrap impregnadas com inseticidas e associadas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, v.27, p.639-644, 1998.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p.289-382, 1998,

ALVES, S. B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S. B (ed). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p.217-236, 1998.

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

ALVES, L. F. A.; GASSEN, M. H.; PINTO, F. G. S.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Ocorrência Natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em Aviário Comercial de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v.34, p.507-510, 2005.

ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR., A, SANTA-CECILIA, 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. **Cultivo de feijão-caupi**. Embrapa Meio Norte, Teresina. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm> > Acesso em: 20 de mar. de 2005.

AINSWORTH, G. C. Introduction and keys to higher taxa. In: AINSWORTH, G. C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S (eds). **The fungi an advanced treatise**. Volumes 4A: taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti, New York : Academic Press, 1973. 621 p.

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

ARRUDA, F. P.; BATISTA, J. L. Efeito da Luz, de Óleos Vegetais e de cultivares de caupi na infestação do caruncho (*Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775)) (Coleoptera: Bruchidae). **Caatinga**, v.1, p.53-57, 1998.

ATHIÉ, I.; DE PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2 ed., São Paulo: Livraria Varela, 2002, 244p.

BALDIN, E. L. L. **Efeitos do tempo e temperatura de armazenamento de grãos de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. na manifestação da resistência ao caruncho *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1931) (Coleoptera: Bruchidae)**. 2001. 110f. Programa de Pós-Graduação em Ciências, Área Entomologia (Doutorado), Ribeirão Preto-SP, 2001.

BALSAMO-CRIVELLI G. Ossevizione sopra una nuova specie di Mucedinea del genere *Botrytis*. **Bibl Ital**, v.79, 1985, 125p.

BARRETO, P. D.; QUINDERÉ, M. A. W. Resistência de genótipos de caupi ao caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.779-785, 2000.

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.

BARTOLI, S.A de.; VAZ FILHO, D. Manejo integrado de pragas e doenças. Universidade Estadual de Paulista. Departamento de Entomologia e Nematologia – CEMIP. Jaboticabal-SP, 1987. 232p.

BRASILEIRO, B. T. R. V.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS JÚNIOR, M. A.; OLIVEIRA, N. T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-Fingerprinting base don PCR markers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v, 35, p.205-210, 2004.

BRETAGNE, S.; COSTA, J.; BESMOND, C.; CARSIQUE, R.; CALDERONE, R. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1777-1780, 1997.

CARNEIRO-LEÃO, M. P. **Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus indianus***. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

CÉSAR FILHO, E.; MARQUES, E. J.; BARROS, R. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. **Scientia Agricola**, v.59, p.457-462, 2002.

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.

COLOZZI FILHO, A.; CARDOSO, E. J. B. N. Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2033-2042, 2000.

CONTINIO, E.; GASQUES, J. G. BELLONI, F. M.; LEONARDI, R. B. A.; V, D. K.; BASTOS, E. T. Projeções do agronegócio mundial e do Brasil. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – ASSESSORIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA, 2005, 74p.

DAL BELLO, G.; PADIN, S.; LOPES LASTRA, C.; 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.

DIEZ, S., GARCIA, E.A., PINO, P. A.; BOTERO, S.; CORREDOR. G. G; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H.; RESTREPO, A. McEWEN, J.G. PCR com «primers» específicos de Paracoccidioides brasiliensis: uso potencial em estudos ecológicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p.351-358, 1999.

DEGRANDE, P. E.; REIS, P. R.; CARVALHO, G. A.; BELARMINO, L.C.; Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais. In: PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; CÔRREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M.(eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p.71-86.

DESTEFANO, Ricardo Henri Rodrigues; DESTEFANO, Suzete A. Lanza; MESSIAS, Claudio Luiz. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p.245-252, 2004.

FAGÉRIA, N. K.; SILVA, O. F.; SILVEIRA, P. M.; STRALIOTTO, R.; SILVA, S. C.; STEINMETZ, S.; COBUCCI, T. Cultivo do feijoeiro comum. Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivo do Feijoeiro / importancia.htm>> acesso em 01 de mai. 2006.

FEIJÓ, F. M. C. Ação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* no desenvolvimento embrionário de *Chrysomya albiceps* sob condições de laboratório. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas), UFPE, Recife, 126p, 2004.

FENG, X.; RICH, S. M.; AKIYOSHI, D.; TUMWINE, J. K.; KEKITIINWA, A.; NABUKEERA, N.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Extensive Polymorphism in *Cryptosporidium parvum* Identified by Multilocus Microsatellite Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 3344–3349, 2000.

FERREIRA, A. N.; ARF, O.; CARVALHO, M. A. C.; ARAÚJO, R. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. *Rhizobium tropici* strains for inoculation of the common bean. **Scientia Agricola**.v.57, p. 507-512, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996, 220p.

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.) Sorok. contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castaniidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p.397-403, 2002.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**. v.14, p.12-16, 2000.

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. **Entomologia Agrícola**, 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.837-838, 2002.

GE, B.; QIN, S.; HAN, L.; LIN, F.; REN, Y. Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.84, p. 175–180, 2006.

GONZALEZ-SANTIAGO, M.; MARTÍN-BAUTISTA, E.; CARRERO, J.J.; FONOLLA, J.; BARO, L.; BARTOLOMÉ, M. V.; GIL-LOYZAGA, P.; LOPEZ-HUERTAS, E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development **Atherosclerosis**, v.188, p.35-42, 2006.

GUEVEN, N.; LUFF, J.; PENG, C.; HOSOKAWA, K.; BOTTLE, S. E.; LAVIN, M. F. Dramatic extension of tumor latency and correction of neurobehavioral phenotype in Atm-mutant mice with a nitroxide antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p.992-1000, 2006.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using primers of simple sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.998-1006, 1994.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J. A. C.; MARTINS, L. H.; PERALTA, C. H.; MOINO JÚNIOR., 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.; MUNYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossinia* spp.) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.66, p.237-241, 1995.

LEOCUONA, R. E.; EDELSTEIN, J. D.; BERRETTA, M. F.; RUBÉN LA ROSSA, F.; ARCAS, J. A. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential

agents for control of *Triatoma infestan* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal Medic Entomology**, v.38, 172-179, 2001.

LIMA, M. L. F. **Caracterização molecular de espécies de *Metarhizium* e patogenicidade sobre *Diatraea saccharalis***. 2005. 89p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

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

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

LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; NERY, G. V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in Central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**, v.33, p.783-791, 2004.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1571, p. 83-88, 2002a.

MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seed on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.891-898, 2002.

MACHOUART-DUBACH, M.; LACROIX, C.; CHAUVIN, M. F.; GALL, I.; GIUDICELLI, C.; LORENZO, F.; DEROUIN, F. Rapid Discrimination among *Dermatophytes*, *Scytalidium* spp. and Other Fungi with a PCR-Restriction Fragment

Length Polymorphism Ribotyping Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 685–690, 2001.

MAGALHÃES, B.P.; SILVA, A. B. **Controle de carunchos em feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] armazenado em óleos vegetais**. Belém-PA. CPATU (Centro de Pesquisa Agropecuário do Trópico Úmido)-EMBRAPA. 1981.2p.

MARQUES, E. K.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. IN: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.(Org.) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, p.101-130.

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.

MAUCHLINE, T. H.; KERRY, B. R.; HIRSCH, P. R. Quantification in Soil and the Rhizosphere of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* by Competitive PCR and Comparison with Selective Plating. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, p. 1846–1853, 2002.

MBATA, G. N.; HETZ, S.K.; REICHMUTH, C.; ADLER, C. Tolerance of pupae and pharate adults of *Callosobruchus subinnotatus* Pic (Coleoptera: Bruchidae) to modified atmospheres: a function of metabolic rate. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p. 145-151, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Levantamento da safra 2003/2004: quarto levantamento**, Brasília: MAPA, 2004, 29p.

MOINO JÚNIOR, A. **Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados**. 1993, 99f. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Piracicaba, 1993.

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

MONTEIRO, S. G.; BAHIANSE, T. C.; BITTENCOURT, V. E. P. A ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato. *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: ixodidae). **Ciência Rural**, v.33, p.559-563, 2003.

MORAES, G.J. de.; RAMALHO, F.S. **Alguns insetos associados a *Vigna unguiculata* (L.) Walp no Nordeste**. Petrolina-PE. EMBRAPA/CPTSA (Centro de Pesquisa Agropecuário do Trópico Semi-árido). 1980.10p

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

MUGNAI, L.; BRIDGE, P. D.; EVANS, H. C. A chematoxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**, v. 92, p.199-209, 1989.

MURO, M. A.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin, **FEMS Microbiology Letters**, v.229, p.249-257, 2003.

MURRAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. A.; SARMENTO, R. B. C.; NORONHA, E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FRANCO, O. L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.142, p.365-370, 2006.

NEVES, PEDRO M.O.J., HIROSE, E.; TCHUJO, P. T.; MOINO JÚNIOR, A. Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides, **Neotropical Entomology**, v.30, p.263-268, 2001.

ODUOR, G. I.; SMITH, S. M.; CHANDI, E. A.; KARANJA, L. W.; AGANO, J. O.; MOORE, D. Occurrence of *Beauveria bassiana* on insect pests of stored maize in Kenya. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.177-185, 2000.

OLIVEIRA, C. N.; JANEIRO NEVES, P.M. O.; KAWAZOE, L. S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. **Scientia Agricola**, v.60, p.663-667, 2003.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L.; MEDEIROS, R. D.; MOREIRA, M. A. B. **A cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Estado de Roraima**. Ano VI – Nº 01. Embrapa – Centro de Pesquisa Agroflorestral de Roraima, 2000, 25p.

ONOFRE, S. B.; VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; BARROS, N. M.; BOLDO, J. T.; NUNES, A. R. F.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico de pragas na agricultura por meio de fungos**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, p.295-318, 2002.

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, E. **Avaliação da Pureza Genética em Sementes de Milho Utilizando Marcadores Microsatélites**, Minas Gerais, 1ed, mar. 2004. Circular Técnica, 3p. Disponível em: < <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/circul30.pdf>> Acesso em: 01 set. 2006.

PADIN, S.; DAL BELLO, G.; FABRIZIO, M. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. **Journal of Stored Products Research**, v.38, p.69-74, 2002

PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; CÔRREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M.(eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, 635p.

PEREIRA, R. P. **Identificação e danos de insetos-brocas em vagem de feijão**. PESAGRO - Rio de Janeiro/Estação Experimental de Campos. p.1-5, 1986.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; SÓSA-GÓMEZ, D. R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p.1097-1118, 1998.

REHNER, S. A; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v.97, p. 84–98, 2005.

REIS, R.C.S., MELO, D.R., SOUZA, E.J.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.544-547, 2001.

REIS, R.C.S., MELO, D. R. e BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.788-791, 2004.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R.; CADENA, H.;ALEXANDER, B. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against Phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.20, p.131-135, 1997.

ROHDE, C.; ALVES, L. F. A.; NEVES, P. O. J.; ALVES, S. B.; SILVA, E. R. L.; ALMEIDA, J. E. M. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Isolates against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.231-240, 2006.

ROSATO, Y. B.; GONÇALVES, E. R.; TAHARA, S. T.; MEHTA, A. Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. IN: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.(Org.) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, p.71-100.

SAMUELS, R. I.; CORACINI, D. L. A. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for the control of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae), **Scientia Agricola**, v.61, p.271-275, 2004.

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

SANTOS, T. S.; DIREITO, I. C. N.; TEIXEIRA, K. R. S. Isolamento e amplificação de DNA das amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações das bactérias em solos agrícolas. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, v. 148, 2002, 36p.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Metodologias da tecnologia do DNA recombinante: uma visão geral de seus princípios. IN: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.(Org.) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, p.13-44.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**, v.101, p.10-19, 2007.

SILVA, C. A. D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 243-247, 2001.

SILVA, S. M.; FREIRE FILHO, F. R. **Proteínas de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]: caracterização e aplicação nutricional**. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, 1999, 20p.

SMITH, S. M.; MOORE, D.; ODUOR, G. I.; WRIGHT, D. J.; CHANDI, E. A, AGANO, J.O. Effect of wood ash and conidia of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on mortality of *Prostephanus truncatus* (Horn). **Journal of Stored Products Research**, v.42, p.357-366, 2006.

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).1994, 28p.

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; FAION, M. PADULLA, L. F. L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.69, p.89-96, 2002.

TOMÉ, P.H.F.; GONÇALVES, R.A.; SANTOS, J.P.; CABRAL, L.C; SANTOS, D.S. Controle de *Zabrotes subfasciatus* B. (COLEÓPTERA: BRUSCHIDAE) em todas as fases de desenvolvimento pela atmosfera controlada com CO₂ e N₂, em feijão. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.26, p.3-9, 2001.

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

WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; RESENDE, M. A.; VALERIO, H. M.; RACHEL B. CALIGIORNE, R. B.; PAIVA, E. Variação genética entre patógenos agentes da doença de "Helminthosporium" de arroz, milho e trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.639-643, 2002.

WHIGHTMAN, J. A.; SOUTHGATE, B. J. Egg morphology, host and probable regions of origin of the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) that infest stored pulses – an identification aid. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v.10, p.95-99, 1982.

WUTKE, E. B.; MASCARENHAS, H. A. A.; BRAGA, N. R.; TANAKA, R. T.; MIRANDA, M. A. C.; POMPEU, A. S.; AMBROSANO, E. J. Pesquisas sobre

leguminosas no Instituto Agronômico e sua contribuição para o desenvolvimento agrícola paulista. **O Agrônomo**, v.53, p.34-37, 2001.

**Capítulo I – AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. PARA
O CONTROLE DO CARUNCHO *Callosobruchus maculatus* (F.) (COLEOPTERA:
BRUCHIDAE) EM GRÃOS DE CAUPI.**

Manuscrito submetido ao Journal of Stored Products Research

AValiação DE LINHagens DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. PARA O CONTROLE DO CARUNCHO *Callosobruchus maculatus* (F.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM GRãos DE CAUPI.

Paz Júnior, F. B. ^{1*}; Guaraná, C. F. R. ²; Lyra, E. S. ³; Santos, V. F. S. ⁴; Luna-Alves Lima, E. A. ⁵; Azevedo, J. L. ⁶

¹CEFET-PE UNED Pesqueira Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE, CEP 55200-000, Pernambuco, Brasil.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Biologia, Área de Ecologia, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Universidade de Pernambuco (UPE), Unidade Petrolina, Av. Cardoso de Sá, Km 02, CEP 50670-420, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

⁴Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, Pernambuco, Brasil

⁵Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Av. Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁶Universidade de Mogi das Cruzes - UMC, Departamento de Microbiologia, Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200, Vila Partênio, CEP 08780-911, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente: Fax: 0055-87-38351796 E-mail: franciscojr2004@yahoo.com.br / fbpjunior@cefetpesqueira.edu.br

Abstract - The cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, is a pest that attacks mainly the beans from the genera *Vigna*, standing out as the most important weevil that occurs in the Brazilian Northeast, where large part of the planted bean belongs to that genera. Thus, the objective of this research was to evaluate the pathogens from different lineages of *Beauveria bassiana* and then select the most efficient to control the adults insects. Adult insects of 24 hours old, were inoculated by using seven lineages from *B. bassiana* (URM2916, URM2921, URM2923, URM2926, URM4544, URM4551, URM4552) in variable concentrations of 10^4 to 10^8 conidia/mL. The inoculation of the fungi lineages was done with the aid of mini pulverized manual. The incubation took place in a climate room ($28\pm 2^\circ\text{C}$) and $75\pm 5\%$ of relative humidity. The percentage of mortality, which varied from 12 to 100% in the elapse of 12 days of this experiment. The lineages of *B. bassiana* showed high level of pathogenics, characteristic evidenced by mortality higher than 40% of the insects treated until the forth day in all conidial concentrations tested. Among all the lineages studied, URM2921, URM2923 and URM4544 were showed as the highly virulent to the target insect, being useful for biological control programs of the cowpea pest.

Resumo

O caruncho do caupi, *Callosobruchus maculatus* é uma praga que ataca principalmente os feijões do gênero *Vigna*, destacando-se como o caruncho mais importante no Nordeste brasileiro, onde a maioria do feijão plantado pertence a esse gênero. Este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de diferentes linhagens de *Beauveria bassiana* e selecionar as mais eficientes para o controle de adultos do caruncho do caupi. Insetos adultos, com 24 horas de idade, foram inoculados com sete linhagens de *B. bassiana* (URM2916, URM2921, URM2923, URM2926, URM4544, URM4551, URM4552) em concentrações variáveis de 10^4 a 10^8 conídios/mL. A inoculação das linhagens fúngicas foi feita com micropulverizador manual. A incubação foi realizada em sala climatizada ($28\pm 2^\circ\text{C}$) e $75\pm 5\%$ de umidade relativa. A percentagem de mortalidade variou de 12 a 100% no decorrer dos doze dias do experimento. As linhagens de *B. bassiana* mostraram-se altamente patogênicas, característica evidenciada pela mortalidade superior a 40% dos insetos tratados até o quarto dia, em todas as concentrações conidiais testadas. Dentre as linhagens estudadas, URM2921, URM2923 e URM4544 apresentaram-se como as mais virulentas ao inseto-alvo, sugerindo sua utilização em programas de controle biológico de pragas do caupi.

Palavras-chave – Controle biológico, fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana*, *Callosobruchus maculatus*, caupi.

1. Introdução

O caupi, feijão-de-corda, macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma cultura de grande importância para o Brasil por se constituir em alimento básico para as populações rural e urbana, por apresentar alto valor protéico, baixo custo comercial, superando em termos nutricionais o feijão comum. Possui vários subprodutos, dentre os quais, grãos e vagens verdes e grãos secos. Suas folhas e ramos podem ser utilizados como complemento na alimentação animal. É uma planta fixadora de nitrogênio, podendo ser utilizada na melhoria de solos que possuem baixa fertilidade. A sua massa verde pode ser incorporada aos solos, sendo utilizada como fonte de matéria orgânica (Andrade Júnior et al. 2005; Vieira, 1998).

O ataque dos carunchos aos grãos pode destruir o embrião, afetando diretamente a germinação, além de conferir gosto desagradável ao produto. Os prejuízos causados por esses insetos traduzem-se, também, em consideráveis alterações no peso e no tipo dos grãos, danos indiretos que facilitam a entrada de microrganismos e ácaros, aquecimento da massa de grãos, perda em seu peso e no valor nutritivo, sendo desvalorizado comercialmente (Magalhães e Carvalho, 1988; Oliveira Júnior et al. 2000).

Várias alternativas de combate aos carunchos têm sido empregadas, tais como a misturas de grãos com cinza de madeira, uso de pimenta-do-reino, substâncias oleaginosas, entre outras. Esses métodos são limitados ou pouco eficazes (Vieira, 1988). O emprego de produtos químicos também tem sido utilizado para o controle do caruncho. Entretanto, o uso inadequado pode causar demandas na reaplicação dos pesticidas, resultando em elevação dos custos com tratamentos, perdas de produtos devido ao controle ineficiente, contaminação dos alimentos e agricultores (Athié e De Paula, 2002). Nesse cenário, os microrganismos entomopatogênicos surgem como uma nova alternativa. Não poluem o ambiente, não são

tóxicos ao homem, apresentam efeito mais duradouro e podem ser usados em associação com inseticidas seletivos.

Dentre os fungos entomopatogênicos mais utilizados no controle biológico, encontra-se *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, que tem se destacado por sua elevada eficácia no controle de insetos-praga do algodoeiro (Silva, 2001), do tomateiro (Giustolin et al. 2001), da cana-de-açúcar (Figueirêdo et al. 2002), de grãos armazenados (Padin et al. 2002; Smith et al. 2006), entre outras culturas de interesse econômico.

Para a maior eficiência e sucesso nos programa de controle microbiano de insetos, faz-se 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 nesses programas (Alves et al. 1998). Desse modo, a pesquisa teve por objetivo avaliar a patogenicidade de linhagens de *B. bassiana* e selecionar os isolados mais eficientes no controle do caruncho do caupi, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius).

2. Material & Métodos

2.1 Linhagens fúngicas

Foram utilizadas sete linhagens de *B. bassiana* da Coleção de Culturas da Micoteca-URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas/CCB da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Procedência das linhagens de *Beauveria bassiana* utilizadas nos experimentos com *Callosobruchus maculatus*.

Nº de acesso da Micoteca	Hospedeiro	Origem geográfica	Ano de estocagem
URM2916	Coleóptero	Brasília, Brasil	1987
URM2921	<i>Lebia concinna</i>	Paraná, Brasil	1987
URM2923	<i>Deois flavopicta</i>	Brasília, Brasil	1987
URM2926	<i>Malacosoma americana</i>	USA	1987
URM4544	<i>Diabrotica speciosa</i>	Tucumán, Argentina	1998
URM4551	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Pernambuco, Brasil	1998
URM4552	<i>Chalcodermus aerus</i>	Goiás, Brasil	1998

2.2 Obtenção e criação dos insetos

Os insetos adultos de *Callosobruchus maculatus* foram obtidos da criação de insetos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Os adultos foram criados em recipientes de vidro com capacidade aproximada de 1L, fechados com tecido fino do tipo “Voil” para permitir a aeração. Os insetos foram confinados durante quatro dias para efetuarem a postura, em seguida retirados e os recipientes estocados até a emergência dos adultos. Este procedimento foi efetuado por sucessivas gerações, de modo a assegurar a quantidade de adultos necessária para a execução da pesquisa. O experimento foi realizado em sala com temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa (u.r) de $70\pm 5\%$.

A dieta alimentar consistiu de grãos de caupi. Os grãos foram acondicionados em sacos plásticos devidamente etiquetados e mantidos em freezer por um período mínimo de 72 horas, a fim de se eliminar possíveis infestações de campo.

2.3 Teste de patogenicidade

O experimento foi conduzido em laboratório (28 ± 2 ° C, $70\pm 5\%$ u.r e 12 horas de fotofase), em delineamento inteiramente casualizado, com seis 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 sete repetições, sendo cada parcela composta de 10 insetos, totalizando 70 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 quatro, de acordo com Alves e Moraes (1998). A inoculação dos insetos foi feita por aspersão de conídios dos patógenos com o auxílio de um mini pulverizador manual, utilizando 0,5mL da suspensão por parcela. A avaliação foi realizada durante nove dias, sendo os insetos mortos transferidos para câmara úmida, para confirmação da mortalidade pelo patógeno.

2.4 Reisolamento dos entomopatógenos.

A partir dos insetos adultos foi realizado quando estes apresentavam a superfície corporal coberta por conídios. Os insetos foram mergulhados em álcool 70% (agente molhante) em seguida, imersos por três minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% e, finalmente, imersos em água destilada esterilizada até a remoção do cloro. Os insetos, colocados em câmara úmida, foram incubados à temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ até a esporulação do fungo. Após a conidiogênese, foram transferidos inóculos do fungo para meio seletivo, em placas de Petri, dispostos em quatro pontos equidistantes (Alves et al. 1998). As estruturas fúngicas dos isolados foram observadas em microscópio óptico para confirmação da mortalidade pelas linhagens de *B. bassiana*.

2.5 Análise estatística

Os dados referentes à mortalidade foram submetidos às 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_{50} (tempo necessário para matar 50% dos indivíduos) das linhagens, os dados das mortalidades foram submetidos a análise de Probit empregando-se o programa POLO PC (LeOra Software, 1987).

3. Resultados & Discussão

A patogenicidade das linhagens foi determinada pela percentagem média de mortalidade, que variou de 12 a 100%, decorridos os nove dias após a inoculação. Embora existam relatos na literatura de longevidade de sete a nove dias para os insetos adultos de *C. maculatus* (Gallo et al. 2002), nas condições laboratoriais do experimento foi observada uma longevidade superior a nove dias para os insetos testados. Dados semelhantes foram observados por Cherry et al. (2005) ao analisarem a mortalidade diária desses insetos em suspensões aquosas com outras linhagens de *B. bassiana*.

De acordo com os dados fornecidos na Tabela 2, ocorreu interação significativa entre as linhagens e as concentrações testadas, expressada pelo aumento considerável na mortalidade dos insetos à medida que se aumentava a concentração de conídios das suspensões. Entretanto a relação observada não seguiu um padrão, já que o efeito interativo observado não foi o mesmo para as linhagens de *B. bassiana* URM4544 e URM4552. Isto pode ser explicado pela variação na intensidade dos fatores de virulência dos diferentes isolados e dos mecanismos de defesa do inseto-alvo (Neves e Hirose, 2005). Há uma grande variabilidade em termos de respostas desses artrópodes aos diferentes patógenos. Uma espécie que é naturalmente susceptível pode expressar algum mecanismo de defesa frente a exposição a um certo agente e, até mesmo a possibilidade de evolução de resistência do inseto a esse patógeno (Omoto e Alves, 1998).

Tabela 2 Percentual médio de mortalidade de *Callosobruchus maculatus* tratados com diferentes concentrações de *Beauveria bassiana* durante nove dias após a inoculação.

Linhagem	Concentrações (Conídios/mL)					Média
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
URM2916	50,48Cb	56,98Cb	67,14Ba	68,73Ba	73,49Ba	63,36c
URM2921	63,33Ab	66,98ABb	69,84ABb	81,75Aa	85,24Aa	73,43a
URM2923	61,11Ac	67,94ABbc	72,54Ab	75,55ABab	82,22Aba	71,87a
URM2926	55,08ABCc	63,33BCbc	69,36ABb	67,30Bb	81,43ABa	67,30bc
URM4544	59,68ABc	73,80Ab	70,63ABb	73,65ABb	82,70Aa	72,09a
URM4551	56,51ABCc	61,11BCbc	68,25ABb	81,11Aa	82,38Aba	69,87ab
URM4552	50,63BCd	66,98ABbc	63,17ABc	72,70ABab	76,51ACa	66,00bc
Tempo (dias)						
01	12,24 Ea	16,73 Da	12,65 Da	14,69Ca	19,80 Ca	15,22f
02	13,67 Eb	20,00 Dab	15,51 CDb	16,32Cb	27,96 Ca	18,69f
03	20,61 Ec	27,35 Dc	25,92 Cc	48,16Bb	79,80 Ba	40,37e
04	41,22 Dd	60,00 Cc	78,57 Bb	92,24Aa	99,18 Aa	74,20d
05	63,88 Cc	81,84 Bb	90,61 Bab	98,37Aa	99,39 Aa	86,78c
06	77,34 Bc	89,79 ABc	97,35 Aab	99,79Aa	99,97 Aa	92,73b
07	88,77 Ab	94,28 Aa	98,57Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	96,33ab
08	95,10 Aa	98,37 Aa	99,18 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	98,53a
09	97,34 Aa	99,39 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	99,35a
Médias	56,69E	65,31D	68,71C	74,40B	80,57A	
CV (%)	9,47					
Teste F (Interação)						
Linhagem (L)	14,29**					
Concentração(C)	120,45**					
Tempo(T)	987,91**					
C x L	2,21**					
T x L	1,20 ^{ns}					
T x C	16,18**					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúsculas nas colunas não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P=0,05). ** significativo; ns, não significativo.

Interação significativa também foi observada entre a concentração conidial e o período, em dias, independente da linhagem analisada. Foi constatada uma mortalidade superior a 50% nos insetos tratados, até o terceiro dia, na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹. Esse índice de mortalidade foi observado, para as demais concentrações, a partir do quarto dia. A mortalidade máxima ocorreu no sétimo dia nas concentrações 10^7 e 10^8 e no nono dia na concentração conidial 10^6 . Resultados semelhantes foram observados por Cherry et al. (2005) em bioensaios por imersão com a linhagem de *B. bassiana* 0362 sobre adultos de *C. maculatus*, sendo a mortalidade de 100% alcançada já no sexto dia. Essa diferença pode estar relacionada ao uso de diferentes linhagens como também ao modo de inoculação do entomopatógeno. Murad et al. (2006) constataram atividade letal inferior a 30% sobre o referido coleóptero testado com diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Acontecimento também exemplificado por Dal Bello et al. (2001) para o controle de pragas de grãos armazenados com as linhagens *B. bassiana* LPS169, ARSEF 5500, 5501, 5502.

As linhagens utilizadas neste trabalho causaram alto índice de patogenicidade ao caruncho do caupi, apresentando índice de mortalidade significativo já nas primeiras vinte quatro horas após a inoculação. As linhagens *B. bassiana* URM2921, URM2923 e URM4544 comportaram-se como as mais patogênicas ao inseto-alvo, apresentando as maiores médias de mortalidade (Tabela 2). A eficiência de *B. bassiana* URM4544 também foi constatada por Silva (2001), na qual o autor obteve uma taxa de mortalidade média de 83% sobre o bicudo-do-algodoeiro, *Anthrenus grandis* Boehn.

Pela análise de Probit, as linhagens testadas não se adequaram ao modelo, por ter ocorrido um χ^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. Cherry et al. (2005) também obtiveram χ^2

elevado para o isolado de *Beauveria bassiana* 0362. Fato também constatado por Rhode et al. (2006) em bioensaios de estimativa de virulência com *B. bassiana* URM4551 e URM4544. Segundo Neves e Hirose (2005), a combinação e intensidade de fatores (variabilidade entre linhagens x entre os insetos) são provavelmente responsáveis pela não adequação ao modelo em questão. Desse modo, optou-se por uma análise de variância com teste e comparação de médias das mortalidades em cada concentração, com regressão polinomial para determinar a equação de tempo/resposta das diferentes linhagens.

Analizando a patogenicidade das linhagens, em função do tempo após a inoculação (Figura 1), observou-se que todas as linhagens apresentaram altos níveis de virulência, evidenciados pela alta taxa de mortalidade dos insetos no decorrer do experimento. A mortalidade máxima do caruncho causada por *B. bassiana* URM2916 ocorreu no entre o oitavo e nono dia após a exposição, apresentando tempo letal médio mais longo quando comparada as demais, compreendido entre o quarto e o quinto dia. Comportamento similar foi observado para *B. bassiana* URM4552. Esses dados foram semelhantes aos encontrados por Loureiro e Monteiro (2005) que obtiveram mortalidade média em torno de 4,06 dias para *B. bassiana* JAB 06 nos experimentos com as formigas cortadeiras *Atta sexdens sexdens* (L.).

B. bassiana URM2921, URM2923, URM2926, URM4551 e URM4544 causaram mortalidade em 50% da população do caruncho em tempo inferior a quatro dias, exceto para *B. bassiana* URM 2916 e URM 4452 (Figura 1). Tefera e Pringle (2003) também testaram a eficácia do entomopatógeno, mostrando redução significativa da população do coleóptero *Chilo partellus* (Swinhoe) nos primeiros quatro dias após tratamento com *B. bassiana*. Os tempos letais medianos desse experimento foram menores que os obtidos por César Filho et al. (2002), para *B. bassiana* 483, 561, 604, 610, 634, 645 e IPA194 contra *Alabama argillacea* (Hübner), que variou de quatro a oito dias.

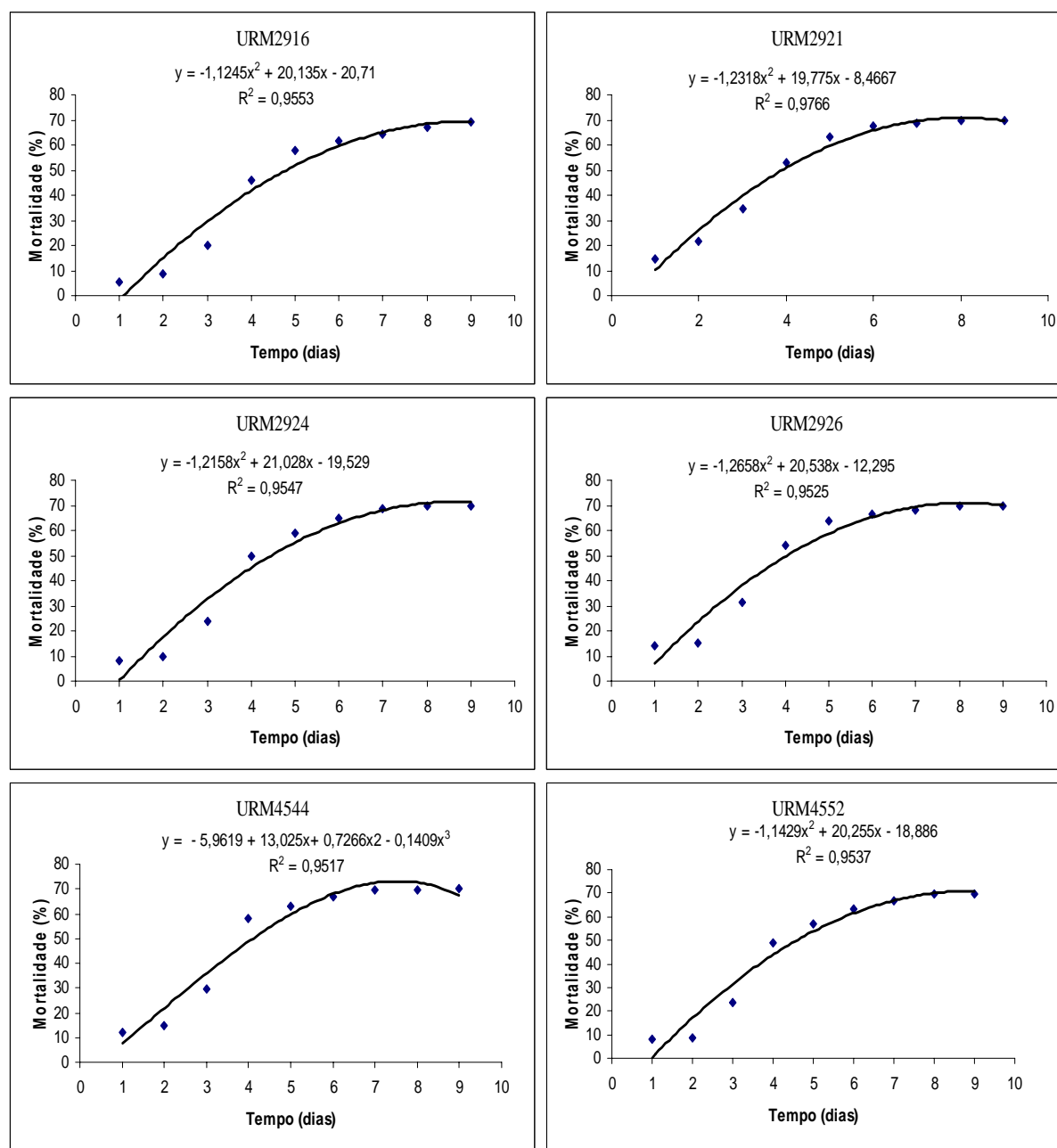


Figura 1. Percentual médio de mortalidade total de *C. maculatus* em função das linhagens de *Beauveria bassiana* e do tempo após a inoculação nos insetos.

4. Referencias

- Alves, S. B., Almeida, J. E. M., Moino Júnior, A., Alves, L. F. A., 1998. Técnicas de laboratório. In: Alves, S. B (Ed), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, pp.637-712.
- Alves, S. B., Moraes, S. A., 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves, S. B. (Ed), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, p. 765-777.
- 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/feijãofaupi/index.htm>.
- Athié, I.; De Paula, D. C., 2002. Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação. São Paulo, Livraria Varela, pp244.
- César Filho, E., Marques, E. J., Barros, R., 2002. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) Caterpillares. Scientia Agricola, 59: 457-462
- 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) Sorokin to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. Journal of Stored Products Research 41, 295-309.

- Dal Bello, G., Padin, S., Lopes Lastra, C., Fabrizio, M., 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. *Journal of Stored Products Research* 37, 77-84.
- Figueirêdo, M. F. S., Marques, E. J., Lima, R. O. R., Oliveira, J., 2002. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium 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*, São Paulo: Agronômica Ceres, p.837-838.
- Giustolin, T. A., Vendramin, J. D., Alves, S. B., Vieira, S. A., 2001. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology* 30, 417-421.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC a user's guide to Probit OR Logit analysis. Shattck Ave, Berkeley, 22p,
- 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 a 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.
- Murrad, A. M., Laumann, R. A., Lima, T. A., Sarmiento, R. B. C., Noronha, E. F., Rocha, T. L., Valadares-Inglis, M. C., Franco, O. L., 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in

- response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. Comparative Biochemistry and Physiology 142, 365-370.
- Neves, P.M.O.J., Hirose, E., 2005. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera:Scolytidae). Neotropical Entomology 34, 77-82.
- 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 Agroflorestral de Roraima. P.25.
- Omoto, C., Alves, S. B., 1998. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: Alves, S. B (Ed), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, p.55-54.
- Padin, S., Dal Bello, G., Fabrizio, M., 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. Journal of Stored Products Research 38, 69-74.
- Rhode, C., Alves, L. F. A., Neves, M. O. J., Alves, S. B., Silva, E. R. L., Almeida, J. E. M., 2006. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology 41, 295-309.
- Silva, C. A. D. 2001. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 36, 243-247.
- Smith, S. M., Moore, D., Oduor, G. I., Wright, D. J., Chandi, E. A., Agano, J. O., 2006. Effect of wood ash and conidia of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on mortality of *Prostephanus truncatus* (Horn). Journal of Stored Products Research 42, 357-366.
- Tefera, T., Pringle, K. L. 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. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84: 220-225.

Vieira, C. 1988. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV, 231p.

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE
Beauveria bassiana **COM BASE NA PCR.**

Manuscrito submetido a publicação no Canadian Journal of Microbiology

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* COM BASE NA PCR.

¹ Paz Júnior, F. B.; ² Pires, A. P. D.; ³ Lyra, E. S.; ⁴ Luna-Alves Lima, E. A.; ⁵ Azevedo, J. L.

¹ CEFET-PE UNED Pesqueira Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE, CEP 55200-000 PE, Brasil. Fone/Fax 0055-87-38351796. www.cefetpesqueira.edu.br, fbpjuniior@cefetpesqueira.edu.br. (Autor para correspondência)

²Aluna de Doutorado da 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

³Universidade de Pernambuco/UPE, Unidade de Petrolina, Av. Cardoso de As, Km 02, CEP 50670-420, Petrolina, PE. Brasil. eslyra2005@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Av. Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE. Brasil. ealal@bol.com.br, ealal@terra.com.br

⁵Universidade de Mogi das Cruzes - UMC, Departamento de Microbiologia, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Beauveria bassiana é um entomopatógeno cosmopolita bastante utilizado no controle de pragas agrícolas, sendo a caracterização molecular uma importante ferramenta na identificação e descrição de genótipos, no mapeamento de genomas e em estudos de variabilidade genética entre populações fúngicas. Neste trabalho, os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) - iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅ baseados na PCR foram utilizados para investigar a diversidade genética de sete linhagens de *Beauveria bassiana* isoladas de diferentes regiões e hospedeiros. Esses iniciadores são usualmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa NTSYS.PC e construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jacard que gerou um dendograma através do método de agrupamento UPGMA. A análise do dendograma mostrou a formação de três grupos para os dois iniciadores utilizados, não havendo correlação com o hospedeiro ou origem geográfica. A análise genética revelou a que os iniciadores foram eficientes em demonstrar a variabilidade intraespecífica entre as linhagens de *B. bassiana*.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, microssatélites, impressão genética por PCR, ISSR

1. INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é um fungo de ocorrência generalizada em todos os países, sendo a mais freqüente sobre os insetos e em amostras de solos, onde pode subsistir por longo tempo em saprogênese (Alves *et al.* 1998). Este entomopatógeno tem se destacado no controle de um grande número de insetos. Vários autores têm registrado sua eficiência contra insetos que atacam cultivares de grande importância para o Brasil (Neves & Hirose, 2005; Luz *et al.*, 2004; Vicentini *et al.*, 2001). Geralmente, os trabalhos descrevem diferenças quanto à patogenicidade entre isolados de *B. bassiana* e poucos são os estudos para determinar variabilidade genética entre isolados. Portanto, para se avaliar o potencial das linhagens encontradas no Brasil, faz-se necessária a caracterização dos isolados a serem estudados (Carneiro *et al.*, 2004).

A caracterização de um microrganismo é de grande valor nos estudos de epizootiologia e de distribuição espaço-temporal, permitindo avaliar sua capacidade de recombinação, como também possibilita o reconhecimento de isolados mais adaptados a um local específico, facilita o entendimento das relações patógeno-hospedeiro e traz informações sobre a variação e estrutura de populações (Sósa-Gómez *et al.*, 1998).

Dentre as técnicas que nos permitem a análise detalhada dos ácidos nucléicos, a PCR (*Polymerase Chain Reacton*) tem se destacado por ser uma técnica que oferece maior facilidade, rapidez e sensibilidade para ser empregadas em pequena ou grande escala (Rosato *et al.*, 2002). Os SSR (*Simple Sequence Repeats*), também chamado de “microssatélites”, são uma variação da PCR que utiliza um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases) complementares a sequência única que flanqueiam a região alvo. Os marcadores SSR expressam co-dominância, são altamente multialélicos e polimórficos (Ferreira & Gattapaglia, 1995). Tais características tornam os

oligonucleotídeos de microssatélites ideais para mapeamento genômico, identificação e descrição de genótipos e estudos de genéticas de populações (Bart-Delabesse *et al.*, 1998; Vainio *et al.*, 1998; Gropper *et al.*, 1995).

O perfil de amplificação com a utilização desses iniciadores revela o possível polimorfismo nas seqüências de nucleotídeos entre duas regiões repetitivas de microssatélites, conhecidas como inter seqüências simples repetidas (ISSR – Inter Simple Sequence Repeats) (Gupta *et al.*, 1994). Esses iniciadores são usualmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. Os quais têm sido utilizados no estudo da diversidade genética no nível intraespecífico em locais complementares para trinucleotídeos repetidos como o (GTG)₅, discriminando *S. cerevisiae* (Baleiras Couto *et al.*, 1996), *Gyromitra esculenta*, *Disciotis venosa* e espécies de *Morchella* (Buscot *et al.*, 1996), *Pisolithus tinctorius* (Anderson *et al.*, 1998), *Cortinarius rotundisporus* (Sawyer *et al.*, 1999), *Monilinia fructicola* e *M. laxa* (Snyder; Jones, 1999), *Suillus grevillei* (Zhihua *et al.*, 2000), *S. paradoxus* (Naumova *et al.*, 2000), *Trichosporon asahii* (Lo-Passo *et al.*, 2001), *Phytophthora capsici* (Youn; Jin, 2001), *Botryosphaeria dothidea* (Zhonghua *et al.*, 2001), espécies de *Exophiala* (Youn; Kyoung, 2002), *Fusarium solani* (Brasileiro *et al.*, 2003), entre outras.

Este trabalho teve por objetivo analisar a variação genética de linhagens de *Beauveria bassiana*, utilizando os marcadores moleculares ISSR - iniciadores (GACA)₄ e (GTG)₅.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Linhagens fúngicas

Foram utilizadas *B. bassiana* obtidas da Coleção de Culturas Micoteca-URM do Departamento de Micologia, CCB, UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Procedência das amostras de *Beauveria bassiana* utilizadas no experimento.

Nº de acesso da Micoteca	Hospedeiro	Origem geográfica	Ano
URM 2916	Coleóptero	Brasília, Brasil	1987
URM 2921	<i>Lebia concinna</i>	Paraná, Brasil	1987
URM 2923	<i>Deois flavopicta</i>	Brasília, Brasil	1987
URM 2926	<i>Malacosoma americana</i>	USA	1987
URM 4544	<i>Diabrotica speciosa</i>	Tucumán, Argentina	1998
URM 4551	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Pernambuco, Brasil	1998
URM 4552	<i>Chalcodermus aerus</i>	Goiás, Brasil	1998

2.2 Obtenção do micélio para extração do DNA genômico

Os fungos, obtidos de culturas monospóricas, foram cultivados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapeck líquido (Lacaz, 1991) sob agitação de 250 rpm, por 96 horas a 28°C. Após esse período, o micélio foi coletado

por filtração a vácuo, lavado com água destilada esterilizada, determinada a massa úmida e estocado a -20°C para posterior extração do DNA.

2.3 Extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico das linhagens de *B. bassiana*, seguiu-se a técnica descrita por Raeder & Broda (1985). A massa micelial foi triturada com nitrogênio líquido até formar um pó, o qual foi transferido imediatamente para um tubo de microcentrifuga onde se adicionou 800 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; Dodecil Sulfato de Sódio 1%). Após homogeneização, os tubos de microcentrifuga foram incubados a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, foram realizados a extração com fenol saturado (Invitrogen Life Technologies), um volume de clorofane (fenol e clorofil misturados na proporção 1:1) e um volume de clorofil (clorofórmio e álcool isoamilico na proporção de 24:1), em seguida, para cada etapa, foram realizadas centrifugações a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e colocado em outro Eppendorf, acrescentando-se NaCl 0,3M e dois volumes de etanol absoluto resfriado a -20°C. Nessa fase foi possível visualizar o DNA precipitado. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos para que o DNA se fixasse no fundo do tubo de microcentrifuga. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante, e lavou-se o precipitado obtido com etanol 70% e centrifugou-se. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e os tubos foram invertidos até secagem completa do DNA. Este, então, foi ressuscitado cuidadosamente com 200 µl de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M).

2.4 Quantificação do DNA genômico e revelação dos géis

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% a $3\text{V}/\text{cm}^{-1}$ de distância entre os eletrodos com o tampão de corrida TBE (Trizma-base 108g; ácido bórico 55g; EDTA 0,5M pH 8,0, 20 ml), por comparação com o marcador de peso molecular DNA de fago λ (Invitrogen Life Technologies).

Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (SAMBROOK *et al.*, 1989) durante 30 minutos, observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado usando filme preto e branco Polaróide 667.

2.5 Amplificação do DNA genômico

As amostras de DNA foram submetidas a PCR utilizando oligonucleotídeos inicializadores listados na Tabela 1, usando Termociclador MJ Research.

Tabela 2. Oligonucleotídeos inicializadores utilizados na amplificação do DNA das linhagens de *B. bassiana*.

Iniciadores	Seqüências	Marcador Molecular	Referências
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	ISSR	Lieckfeld <i>et al.</i> (1993)
(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	ISSR	Meyer & Mitchel (1995)

2.6 Amplificação dos ISSR

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25µL: do tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), MgCl₂ 0,75 mM, dNTP 0,25mM, 0,25 µL dos iniciadores, *Taq* DNA polimerase 0,1U (Invitrogen Life Technologies) e 50 ng do DNA. Para amplificação foi utilizado o termociclador MJ Research com a seguinte programação: desnaturação inicial 93°C por 5 minutos, 40 ciclos a 93°C por 20 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos e extensão final 72°C por 6 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 3 V/cm em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen Life Technologies) para o iniciador (GTG)₅ (Lieckfiedt *et al.*, 1993) e 100 pb (Invitrogen Life Technologies) para os iniciadores (GACA)₄ (Meyer *et al.*, 1995). Após a migração eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 30 minutos, observado em transiluminador ultravioleta e fotografado usando o filme polaroide 667.

2.7 Análise computacional dos dados

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Numerical Taxonomy System de Multivariate Programs - NTSYS-PC (ROHLF, 1988), tendo sido introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1 (um) para presença de banda e número 0 (zero), ausência. Dessa forma, o programa construiu uma matriz de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), calculado de acordo com a formula: $J = A/(P-D)$, onde A é o número de concordância positivas, ou

seja, de variáveis presentes; P o número total de bandas e D o número de concordâncias negativas, ou seja, variáveis ausentes.

A partir dos resultados foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise das regiões de ISSR - (GTG)₅ e (GACA)₄

Os iniciadores (GTG)₅ e (GACA)₄ foram analisados quanto à capacidade para diferenciar linhagens de uma mesma espécie. As Figuras 1 e 2, ilustram os perfis obtidos da amplificação de sete diferentes linhagens de *B. bassiana* com os iniciadores (GTG)₅ e (GACA)₄, respectivamente, permitindo a discriminação de todas as linhagens analisadas.

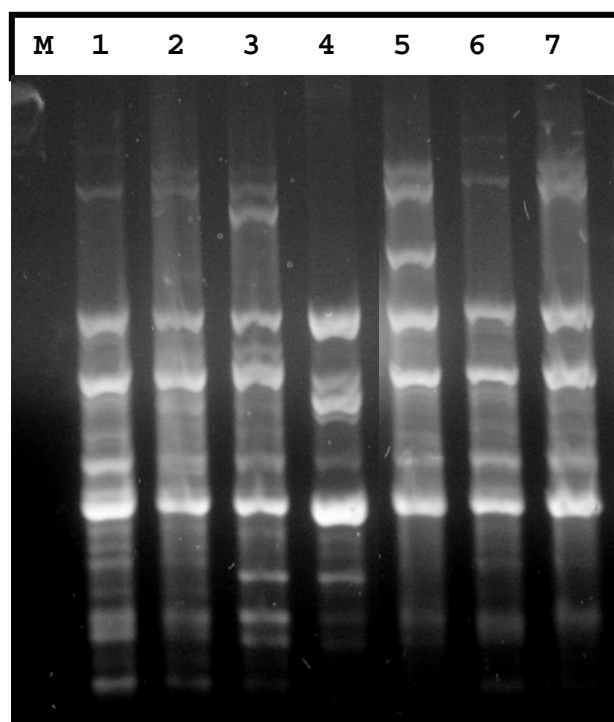


Figura 1. Perfil de amplificação de ISSR de linhagens de *Beauveria bassiana* com o iniciador (GTG)₅. Na pista M, marcador molecular de peso molecular 1 Kb; nas pistas de 1 a 7, encontram-se os DNA das linhagens 2916, 2921, 2923, 2926, 4544, 4551 e 4552, respectivamente.

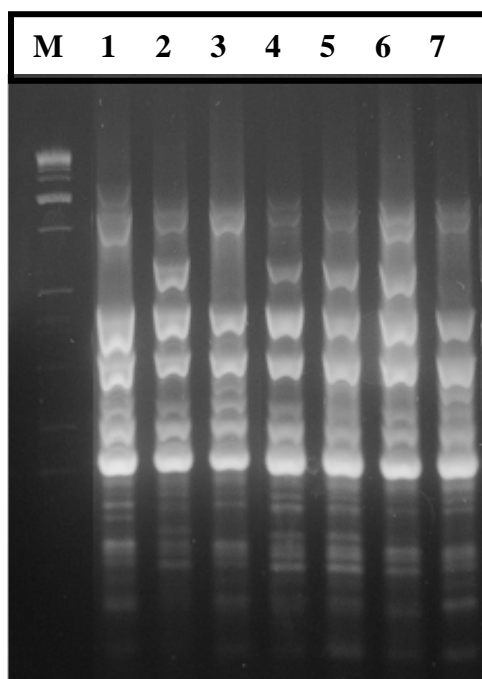


Figura 2. Perfil de amplificação de ISSR de linhagens de *Beauveria bassiana* com o iniciador (GACA)₄. Na pista M, marcador molecular de peso molecular 100 pb; nas pistas de 1 a 7, encontram-se os DNA das linhagens 2916, 2921, 2923, 2926, 4544, 4551 e 4552, respectivamente.

O agrupamento dos cinco perfis de *B. bassiana* gerado pela amplificação com iniciador (GTG)₅ mostrou a formação de três grupos distintos, com cerca de 59% de fragmentos comuns entre eles (Figura 3). O grupo 1, maior grupo, é composto por dois subgrupos. O primeiro subgrupo constituído pelas linhagens 4544, 4551 e 2926 com cerca de 100% de similaridade entre elas. O segundo subgrupo pelas linhagens 4552 e 2923 com aproximadamente 89% de similaridade e distância genética em torno de 79% do primeiro subgrupo. O segundo grupo, formado unicamente pela linhagem 2921, relaciona-se com o primeiro grupo ao nível de 74% de similaridade. O terceiro grupo é constituído por uma única

linhagem 2916, a qual foi a mais distinta através da análise de distâncias genéticas pelo método de agrupamento, com cerca de 59% de similaridade, em relação aos demais grupos.

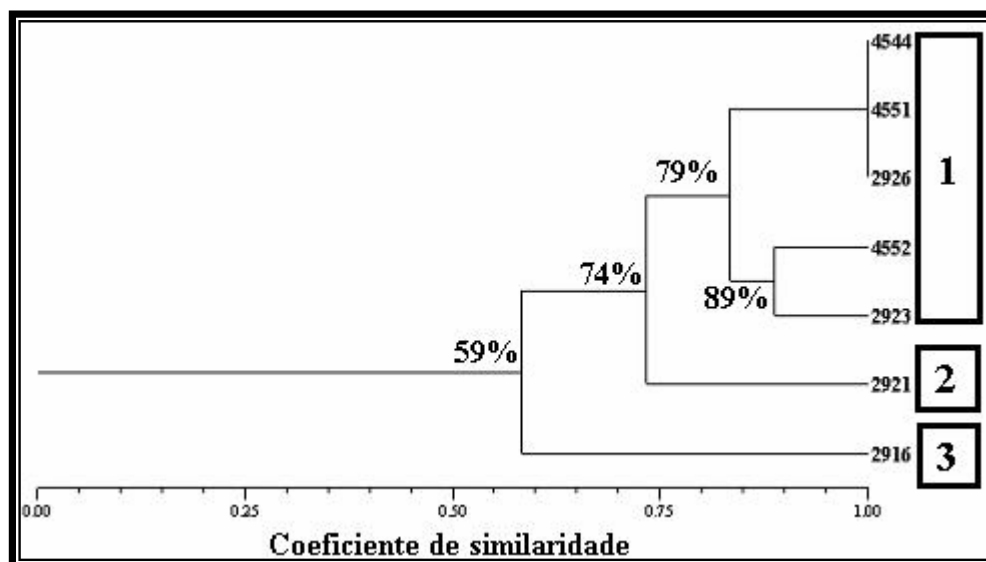


Figura 3. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil do marcador ISSR – iniciador (GTG)₅ obtidos das sete linhagens de *Beauveria bassiana*.

A amplificação com iniciador (GACA)₄ também gerou cinco perfis de *B. bassiana* e foram agrupados em três grupos (Figura 4). O primeiro grupo representado pela linhagem 4544 com cerca de 54% de similaridade, em relação aos demais grupos. O segundo pelas linhagens 4551 e 4552 com aproximadamente 84% de similaridade entre elas e 69% de homologia com o grupo 3. O terceiro grupo é composto por dois subgrupos. O primeiro subgrupo constituído pelas linhagens 2916, 2923 e 2926 com 100% de similaridade entre elas. O segundo subgrupo formado por uma única linhagem 2921 que apresentou cerca de 75% de fragmentos comuns com o primeiro subgrupo.

As linhagens que obtiveram 100% de similaridade com o iniciador (GTG)₅ não representam o mesmo grupo com o iniciador (GACA)₄, mostrando a formação da identidade genética de cada tipo de linhagem gerada pelo padrão de fragmentos.

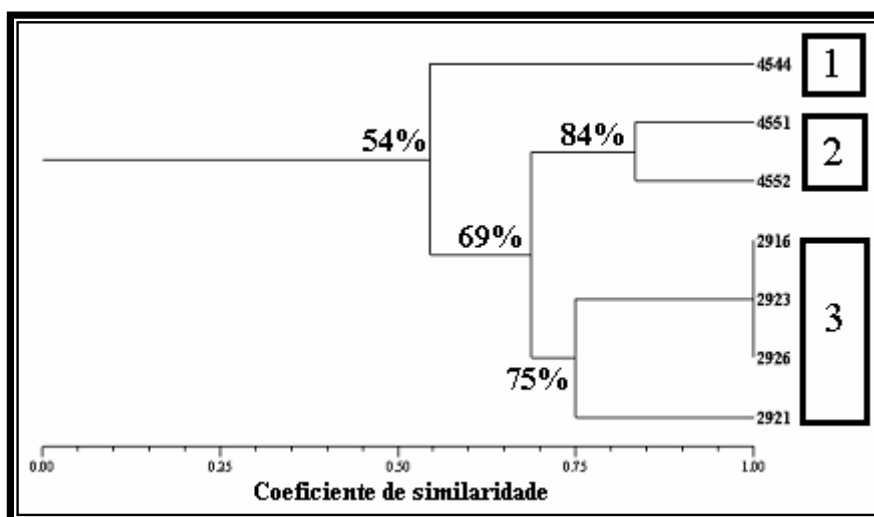


Figura 4. Dendrograma construído pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir do perfil do marcador ISSR – iniciador (GACA)₄ obtidos das sete linhagens de *Beauveria bassiana*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, I.C; Chambers, S.M. & Cairney, J.W.G. 1998. Use of molecular methods to estimate the size and distribution of mycelial individuals of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Mycological Research*. 102: 295-300.

Baleiras Couto, M.M.; Hartog, B.J.; Huis In't Veld, J.H.J.; Hofstra, H. & Van Der Vossen, J.M.B.M. 1996. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiology*. 13: 59-67.

Bart-Delabesse, E.; Humbert, J.; Delabesse, E.; Bretagne, S. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*. 36: 2413-2418.

Brasileiro, B. T. R. V.; Coimbra, M. R. M.; Morais Júnior, M. A.; Oliveira, N. T. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-Fingerprinting base don PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 205-210.

Buscot, F.; Wipf, D.; Battista, C.Di; Munch, J.-C.; Botton, B. & Martin, F. 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research*. 100: 63-71.

Carneiro, A. A.; Gomes, E. A.; Nonato, L. F. V.; Britto, W. M. A.; Fernandes, F. T.; Carneiro, N. P.; Guimarães, C. T.; Cruz, I. 2004. Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do milho – *Beauveria*

bassiana versus *Spodoptera frugiperda*. Sete Lagoas: Embrapa.CNPMS, 10p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 93).

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1995, Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp.220.

Groppe, K.; Sanders, I.; Wiemken, A.; Boller, T. A 1995. Microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloe* Spp.) In Grasses. Applied and Environmental Microbiology. 61:3943–3949.

Gupta, M.; Chyi, Y.S.; Romero-Severson, J. & Owen, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics. 89: 998-1006.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution horale. Bulletin de la Société Vand des Sciences Naturalles. 44: 223-270.

Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. 1991. Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, pp.695.

Lickfeldt, E.; Meyer, W. Börner, T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprint. Journal of Basic Microbiology. 33: 413-426.

Lo Passo, C.; Pernice, I.; Celeste, A.; Perdichizzi, G. & Todaro-Luck, F. 2001. Transmission of *Trichosporon asahii*-Ösophagitis durch ein kontaminiertes endoskop. *Mycoses*. 44: 13-21.

Luz, C.; Rocha, L.F.N.; Nery, G. V. 2004. Detecção de fungos entomopatogênicos em áreas peridomiciliares infestadas por triatomíneos no Brasil central e atividade dos fungos contra *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*. 33: 783-791.

Meyer, W.; Mitchell, T. G. 1995. Polimerase chain reaction fingerprint in fungi three using single primers specific to minissatélites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis*. 6: 1648-1656.

Raeder, U.; Broader, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1: 17-20.

Naumova, E.S.; Naumov, G.I. & Molina, F.I. 2000. Genetic variation among European strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*. 23: 86-92.

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

Rohlf, F. J. NTSYS-PC 1988. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics, Inc. New York: Exeter Publication, pp.218.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2th. New York: Cold Spring Harbor, pp.89.

Sawyer, N.A.; Chambers, S.M. & Cairney, W.G. 1999. Molecular investigation of genet distribution and genetic variation of *Cortinarius rotundisporus* in eastern Australian sclerophyll forests. New Phytology. 142: 561-568.

Snyder, C.L. & Jones, A.L. 1999. Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. Canadian Journal of Plant Pathology. 21: 70-77.

Vicentini, S.; Faria, M.; Oliveira, M. R.V. 2001. Avaliação de isolados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre ninfas do biótipo B de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) com descrição de nova metodologia de bioensaio. Neotropical Entomology. 30: 97-103

Youn, C.H. & Jin, J.H. , 2001. Estimation of genetic variation of Korean isolates of *Phytophthora capsici* by using molecular markers. Mycobiology. 29: 43-47.

Youn, C.H. & Kyoung, K.Y. 2002. Molecular analysis of *Exophiala* species using molecular markers. Mycobiology. 30: 1-4.

Zhihua, Z.; Miwa, M. & Hogetsu, T. 2000. Genet distribution of ectomycorrhizal

fungus *Suillus grevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. Journal Plant Research. 113: 365-374.

Zhonghua, Ma.; Boehm, E.W.A.; Luo, Y. & Michailides, T.J. 2001. Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from pistachio and other hosts in California. Phytopathology. 91: 665-672.

Capítulo III – Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin com Inseticidas Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae).

Manuscrito submetido a publicação na Neotropical Entomology

Francisco Braga da Paz júnior

CEFETPE UNED Pesqueira

Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE,

CEP 55200-000 PE, Brasil.

fbpjúnior@cefetpesqueira.edu.br

Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin com Inseticidas
Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi *Callosobruchus maculatus* (Fabricius)
(Coleoptera: Bruchidae).

Francisco B. da Paz Jr¹; Carlos F. R. Guaraná²; Eliana S. Lyra³; Elza A. Luna-Alves Lima⁴,
João L. Azevedo⁵.

¹ CEFET-PE UNED Pesqueira Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE, CEP 55200-000
PE, Brasil. www.cefetpesqueira.edu.br, fbpjúnior@cefetpesqueira.edu.br

²Universidade 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, guarana@db.ufrpe.br

³ Universidade de Pernambuco/UPE, Departamento de Biologia, Av. Cardoso de As, Km 02,
CEP 50670-420, Petrolina, PE. Brasil. eslyra2005@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento
de Micologia, Av. Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE.
Brasil. ealal@bol.com.br, ealal@terra.com.br

⁵ Universidade de Mogi das Cruzes - UMC, Departamento de Microbiologia, São Paulo,
Brasil.

Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin com Inseticidas
Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi *Callosobruchus maculatus* (Fabricius)
(Coleoptera: Bruchidae).

Francisco B. da Paz Jr¹; Carlos F. R. Guaraná²; Eliana S. Lyra³; Elza A. Luna-Alves Lima⁴,
João L. Azevedo⁵.

Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with Chemical Insecticides Seeking the Control of the Woodworm of the Cowpea *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae).

ABSTRACT - The use of selected insecticides as strategy in the Integrated Pest Management (IPM), associates to the entomopathogenic agents can increase the efficiency of the control, reducing the amount of agricultural defensives and minimizing the risks of environmental contamination. This work had for objective to evaluate, *in vitro*, the fungitoxic effect of the chemical products Imidaclopride (Confidor 700 GR), Deltamethrin (Decis 25 SC and K-otriline CE 25), Carbaril (Sevin 480 SC) and Azadirachtin (Quimióleo), used in beans cultures on the vegetative growth and conidiogenesis of strains of *Beauveria bassiana*. The insecticides were added to culture medium potato-dextrose-agar (PDA), still liquid ($\pm 45^{\circ}\text{C}$), in the concentrations recommended for the manufacturers for applications in field. After the inoculation of the fungi, the plates were incubated in climatized room $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 hours of photophase and $75\pm 5\%$ relative humidity. Independents of the used insecticides the strains *Beauveria bassiana* URM2923, URM2926 and URM4552 had presented the biggest taxes of growth, while strain *Beauveria bassiana* URM4544 presented the average minor of growth to the twelve days of incubation. The compatibility of the insecticides with the strains of *B. bassiana* varied widely inside of each strain and between the studied insecticides. Deltamethrin and Imidaclopride were the agricultural defensives that had presented the lesser inhibitory effect on the mycelial growth and conidiogenesis of the colonies of *B. bassiana* when compared with the group it has controlled. On the other hand, the Azadirachtin was the chemical product that presented greater fungitoxic effect on the growth of the fungi, not being compatible to the entomopathogens.

KEY WORDS: Entomopathogenic fungus, biological control, insecticides, *Vigna unguiculata*, cowpea.

RESUMO

O uso de inseticidas selecionados como estratégia no Manejo Integrado de Pragas (MIP), associados aos agentes entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle, reduzindo a quantidade de defensivos agrícolas e minimizando os riscos de contaminação ambiental. Este trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito fungitóxico dos produtos químicos Imidaclopride (Confidor 700 GR), Deltametrina (Decis 25 SC e K-otrhone CE 25), Carbaril (Sevin 480 SC) e Azadiractina (Quimióleo), utilizados em culturas de feijão sobre o crescimento vegetativo e a conidiogênese de *Beauveria bassiana*. Os inseticidas foram adicionados ao meio de cultura batata-dextrose-água (BDA), ainda líquido ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para aplicações em campo. Após a inoculação dos fungos, as placas foram incubadas em sala climatizada a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotofase de 12 horas e umidade relativa de $75\pm 5\%$. Independente do inseticida utilizado, as linhagens de *Beauveria bassiana* (URM2923, URM2926 e URM4552) apresentaram as maiores taxas de crescimento, enquanto *Beauveria bassiana* URM4544 apresentou a menor média de crescimento aos doze dias de incubação. A compatibilidade do inseticida variou entre as linhagens e os inseticidas estudados. Deltametrina e Imidaclopride foram os defensivos agrícolas que apresentaram os menores efeitos inibitórios sobre o crescimento micelial e a conidiogênese de *B. bassiana*, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a Azadiractina foi o produto químico que apresentou maior efeito fungitóxico sobre o crescimento fúngico, não sendo compatível com o agente entomopatogênico.

PALAVRAS-CHAVE: Fungo entomopatogênico, controle biológico, inseticidas, *Vigna unguiculata*, caupi.

Introdução

O Brasil é o maior produtor de feijão com uma produção anual na ordem de dois milhões de toneladas, o que equivale à cerca de 20% da produção mundial (Aragão *et al.* 1998, Tomé *et al.* 2001). Segundo Stonel & Sartorato (1994) estimativas das perdas da produção total do feijão no Brasil devido ao ataque dos insetos no armazenamento giram em torno dos 30%.

O método de controle mais empregado contra os carunchos é o químico. Vários produtos fitossanitários estão sendo comercializados para o uso na cultura do feijoeiro (Quintela & Ferreira 2006). Esses produtos fitossanitários caracterizam-se por apresentarem elevada toxicidade, baixa seletividade aos inimigos naturais, gerando vários problemas, inclusive resistência a inseticidas e consequentemente o surgimento de pragas secundárias que inibem os inimigos naturais, o aumento de riscos para a saúde humana, a contaminação de nascentes dos rios 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, de uma conscientização dos problemas advindos do uso intensivo de inseticidas e o elevado custo desses defensivos agrícolas, o controle microbiano assume um papel cada vez mais importante no Manejo Integrado de Pragas (Cruz 2002).

Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes naturais no controle de insetos-praga. No MIP, o controle microbiano utilizando fungos entomopatogênicos é uma alternativa importante na redução da densidade populacional das pragas agrícolas (Kaaya 1989, Tefera & Pringle 2003). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin é um bom candidato para o controle do caruncho, visto o sucesso alcançado como controlador de insetos pragas,

tais como a mosca branca (Faria & Wraight 2001), a traça-do-tomateiro (Giustolin *et al.* 2001), os carrapatos (Reis *et al.* 2001), a broca gigante da cana-de-açúcar (Figueirêdo *et al.* 2002), o curuquerê-do-algodoeiro (César Filho *et al.* 2002), os percevejos (Samuels & Coracini 2004), os cupins (Neves & Alves 2004), os ácaros (Oliveira *et al.* 2004), entre outros.

O uso de inseticidas pode afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos, 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 e minimizando os riscos de contaminação e o surgimento de genes de resistência (Moino Jr & Alves 1998, Quintela & MacCoy 1998).

A interação entre os produtos químicos e os 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.* 200, Mourão *et al.* 2003, Andaló *et al.* 2004).

Este trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito fungitóxico de produtos fitossanitários utilizados em culturas de feijão sobre o desenvolvimento de *B. bassiana*, visando fornecer subsídios para a escolha de produtos seletivos que possam ser utilizados em associação com esse fungo, numa estratégia de Manejo Integrado de Pragas.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil. Foram utilizadas linhagens de *B. bassiana* obtidas da Coleção de Culturas Micoteca-URM do Departamento de Micologia, CCB, UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de *Beauveria bassiana* utilizadas no experimento.

Nº de acesso da Micoteca	Hospedeiro	Origem geográfica
URM2916	Coleóptero	Brasília, Brasil.
URM2921	<i>Lebia concinna</i>	Paraná, Brasil.
URM2923	<i>Deois flavopicta</i>	Brasília, Brasil.
URM2926	<i>Malacosoma americana</i>	Estados Unidos da América
URM4544	<i>Diabrotica speciosa</i>	Tucumán, Argentina.
URM4551	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Pernambuco, Brasil.
URM4552	<i>Chalcodermus aerus</i>	Goiás, Brasil.

Linhagens fúngicas e inseticidas utilizados.

As linhagens de *Beauveria bassiana* utilizadas no trabalho estão listadas na Tabela 1. O efeito dos produtos fitossanitários químicos sobre os fungos foi estudado avaliando-se o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos entomopatógenos na presença ou ausência dos princípios ativos. Os inseticidas foram adicionados a Batata-Dextrose-Ágar

(BDA), da Oxoid ainda líquido ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para aplicações no campo (Tabela 2).

Tabela 2. Inseticidas químicos, registrados para a cultura do caupi, utilizados nos testes de compatibilidade com as linhagens fúngicas.

Nome		Grupo químico	P.C*	C. T**
Comercial	Técnico			
Confidor 700 GrDA	Imidaclopride	Neonicotinóide	150g/ ha	4
Decis 25 SC	Deltametrina	Piretróide	30mL/100L	3
K-otrhone CE 25	Deltametrina	Piretróide	6mL/1L	3
Quimióleo	Azadiractina	-	2L/100L	4
Sevin 480 SC	Carbaril	Metilcarbamato de Naftila.	225 mL/100 L	3

*Dose do produto comercial; **Classificação toxicológica: 3 – Medianamente Tóxico; 4 - Pouco Tóxico.

Mensuração do crescimento micelial.

Foram preparadas cinco placas (BDA + inseticidas) por tratamento, sendo a inoculação fúngica realizada com auxílio de uma alça de platina, no centro de cada placa, com BDA. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), fotofase de 12 horas, $75\pm 5\%$ de umidade relativa 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. Após medido foi considerado o diâmetro médio de cada colônia, das cinco placas.

Produção de conídios e análise de germinação.

Com auxílio de um bisturi, discos de 1cm^2 do bordo de cada colônia foram transferidos 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, conforme metodologia de 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): $G \% = n \times 100/500$, onde **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 trabalhadas 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 7 x 6 (sete linhagens e seis tratamentos) com cinco repetições, sendo os dados submetidos à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% 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, segundo Euclides (1985).

Resultados e Discussão

A análise de variância mostrou interação significativa entre as linhagens e os tratamentos nos intervalos de tempo analisados. Os valores médios do crescimento radial, aos doze dias, das linhagens de *B. bassiana* (URM2921, URM2923, URM2926 e URM4544) não diferiram significativamente entre si, independentemente do inseticida utilizado, mostrando que a taxa de crescimento para as linhagens foram estatisticamente semelhantes. A linhagem *B. bassiana* URM4544 foi a que apresentou menor média e taxa de crescimento (Tabela 3, Fig. 1).

Quanto à interação com os inseticidas, nos intervalos de tempo, independente da linhagem, K-otrhine, Decis e Confidor foram, nesta ordem, os defensivos agrícolas que apresentaram os menores efeitos inibitórios médios de crescimento micelial das colônias de *B. bassiana* quando comparado ao grupo controle.

Tomando-se como modelo a equação de regressão $y = 0,605 + 0,3742x$ da linhagem *B. bassiana* URM4552, (Fig.1), onde o **y** é a estimativa de crescimento das colônias em um determinado tempo **x**, com **b = 0,3742** pode-se interpretar da seguinte forma: a cada 24 horas há um aumento no diâmetro da colônia de 0,3742 cm. Com base no valor de **b**, para cada fungo analisado, pode-se inferir que as linhagens de *B. bassiana* URM2923, URM2926 e URM4552 foram as que apresentaram maior taxa de crescimento, independente do tipo de inseticida ao qual estavam associadas.

Tabela 3. Comparação dos valores médios do diâmetro das colônias (cm) das linhagens de *Beauveria bassiana* e tratamentos em intervalos de tempo.

Linhagens	Tempo (dias)				Média
	3°	6°	9°	12°	
URM2916	0,73 ^a	1,92a	2,74abc	3,78ab	2,29 a
URM2921	0,73 ^a	1,65b	2,52cd	3,53bc	2,11 b
URM2923	0,43c	1,52b	2,78ab	3,94a	2,17 b
URM2926	0,59b	1,59b	2,50d	3,89a	2,14 b
URM4544	0,82 ^a	1,84a	2,54cd	3,30c	2,12 b
URM4551	0,76 ^a	1,84a	2,67bcd	3,46c	2,18ab
URM4552	0,50bc	1,60b	2,90a	3,81ab	2,20ab
Tratamentos					
Confidor 700	0,63c	1,90c	3,16b	4,36bc	2,51 c
Decis 25	0,88ab	2,04b	3,11b	4,13c	2,54bc
K-otrhine	0,80 b	2,06b	3,14b	4,49b	2,62b
Quimióleo	0,51d	0,96d	1,36c	1,68e	1,13d
Sevin 480	0,12 e	0,73e	1,19c	2,02d	1,02e
Controle	0,96 ^a	2,053a	4,02a	5,34a	3,21a
Médias	0,65	1,70	2,66	3,67	2,17
CV(a) %	17,46	9,99	8,95	9,31	11,64
CV(b)%	-	-	-	-	10,35
Tukey (P=0,01)					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

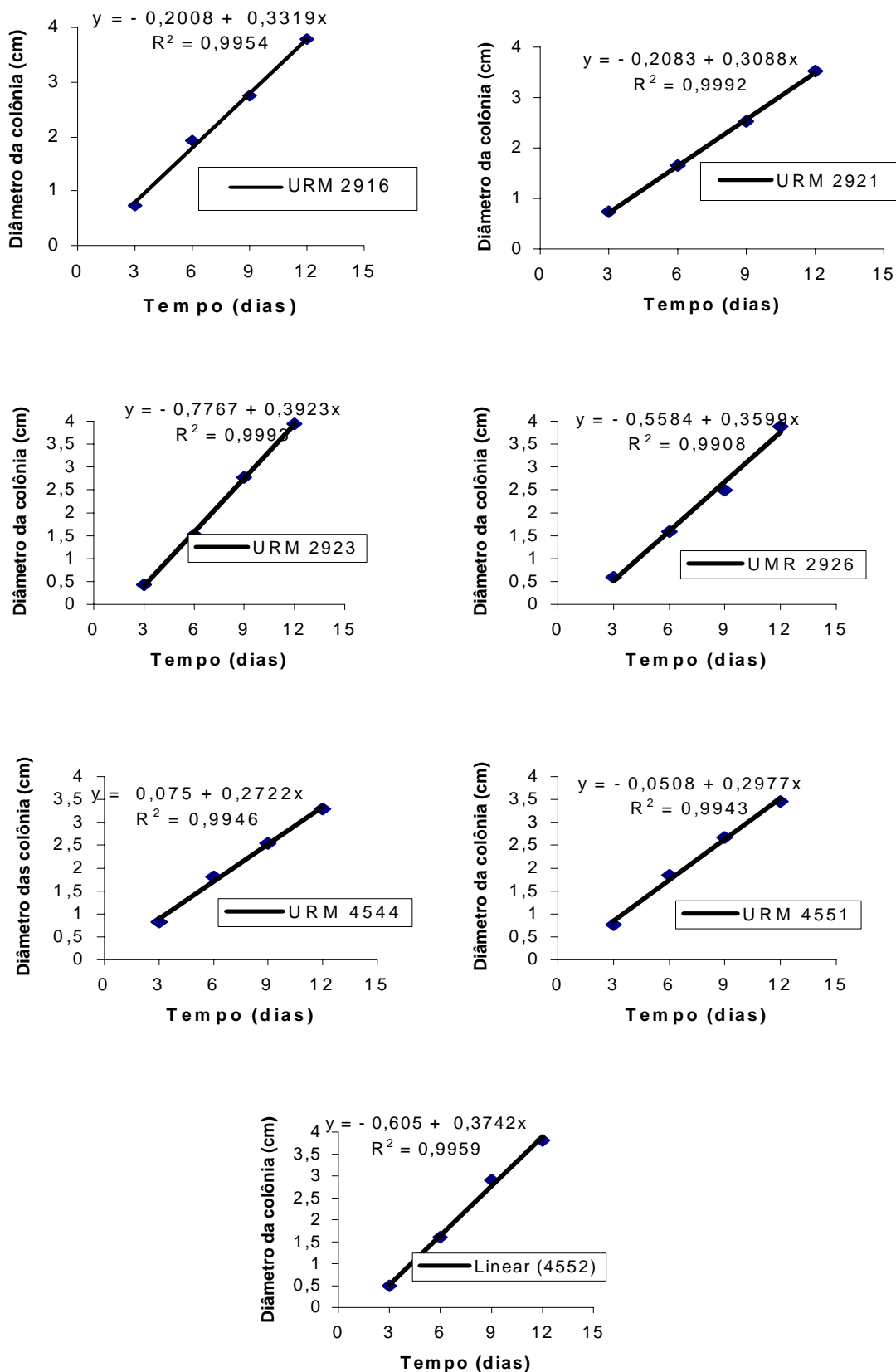


Figura 1. Estimativas de crescimento das linhagens, independentemente do inseticida utilizado, em função do tempo.

Num processo de resistência fisiológica, os fungos podem metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, utilizando as moléculas liberadas no meio de cultura resultantes desse processo como nutrientes, promovendo o seu crescimento vegetativo e conidiogênese. Numa outra possibilidade, na presença de um agente tóxico que prejudique o seu desenvolvimento, os fungos utilizam todo seu esforço reprodutivo, aumentando o crescimento vegetativo e a conidiogênese (Moino Jr & Alves 1998).

Não houve efeito inibitório significativo do produto químico imidaclopride (Confidor) sobre as linhagens de *B. bassiana* URM2916 (2,89cm) e *B. bassiana* URM4552 (2,92cm). As médias do diâmetro das colônias nos tratamentos foram semelhantes às médias do grupo controle (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Loureiro *et al.* (2002) ao avaliarem o desenvolvimento da linhagem de *B. bassiana* CB66 sob ação desses inseticidas.

Para o produto Decis, *B. bassiana* URM4551 teve melhor desempenho médio de crescimento vegetativo, diferindo significativamente em relação às outras testadas. Analisando o mesmo parâmetro em relação ao inseticida K-otrhone, *B. bassiana* URM2926 apresentou maior efeito inibitório quando comparado à testemunha. Segundo Oliveira *et al.* (2004) moléculas presentes no citoplasma podem afetar a membrana plasmática e a síntese enzimática e, conseqüentemente afetar os processos metabólicos, acarretando na diminuição do crescimento vegetativo do fungo.

Redução significativa do crescimento radial foi observada para todas as linhagens em todos os tratamentos com os produtos Quimióleo e Sevin, sendo evidenciado escurecimento na placa com BDA próximo aos bordos da colônia, nas linhagens associadas a este último produto. De acordo com Silva & Espósito (2004), os fungos podem adaptar rapidamente seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e de energia, devido à produção

de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de decompor a estrutura molecular de uma série de compostos, inclusive inseticidas químicos.

Tabela 4. Diâmetro (cm) médio das colônias de *Beauveria bassiana*, após 12 dias de inoculação em meio de cultura contendo inseticidas nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para aplicação em campo. Fotofase de 12 horas e $75\pm 5\%$ UR.

Linhagens	Tratamentos					
	Confidor	Decis 25	K-otrhine	Quimióleo	Sevin 480	Controle
URM2916	2,89abA	2,58bB	2,57abB	1,22aC	1,45aC	3,02cA
URM2921	2,02cC	2,56bB	2,64aB	1,36aD	0,90bcE	3,16bcA
URM2923	2,88abB	2,43bC	2,67aBC	0,77bD	0,86bcD	3,37abA
URM2926	2,62bB	2,47bB	2,36bB	0,92bD	1,14aC	3,08cA
URM4544	2,24cC	2,41bBC	2,66aB	1,42aD	0,77cE	3,20bcA
URM4551	2,01cD	2,94aB	2,62abC	1,36aE	0,64cF	3,54aA
URM4552	2,92aAB	2,39bC	2,84aB	0,87bD	1,08bD	3,12bcA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P=0,01$)

A suscetibilidade do *B. bassiana* aos produtos químicos utilizados para o controle de pragas do feijoeiro variou amplamente dentro de cada linhagem e entre os inseticidas testados (Tabela 5). De acordo com Alves *et al.* (1998), a ação desses produtos pode variar em função da espécie e da linhagem do entomopatógeno. Este fato pode explicar os diferentes resultados obtidos com essa espécie de fungo por diferentes autores.

O produto comercial Confidor, pertencente ao grupo químico imidaclopride, foi o único inseticida que apresentou variações quanto à seletividade com as linhagens testadas em todas as classes toxicológicas: MT = *B. bassiana* URM2921, T = *B. bassiana* URM2923, MdT = *B. bassiana* URM2916, URM2924 e URM4551, sendo compatíveis com as linhagens *B. bassiana* URM4544 e URM4552. Purwar & Sachan (2005) Tamai *et al.* (2002) também verificaram o efeito sinérgico na associação desse inseticida sobre o desenvolvimento de outros agentes entomopatogênicos.

Tabela 5. Toxicidade e compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados em culturas de caupi para *Beauveria bassiana* em condições de laboratório.

Linhagens	Inseticidas									
	Confidor		Decis		K-otrhone		Oleo Vegetal		Sevin	
	Valor ¹	C. T ²	Valor	C. T	Valor	C. T	Valor	C. T	Valor	C. T
	de T		de T		de T		de T		de T	
URM2916	57,20	MdT	65,76	C	94,82	C	24,42	MT	57,42	MdT
URM2921	29,49	MT	41,62	T	38,75	T	19,44	MT	40,28	T
URM2923	44,22	T	81,88	C	95,50	C	49,65	MdT	38,51	T
URM2926	53,58	MdT	101,8	C	49,73	MdT	51,48	MdT	77,50	C
URM4544	78,70	C	62,80	C	85,80	C	56,10	MdT	84,56	C
URM4551	53,76	MdT	42,82	T	98,30	C	30,75	MT	49,02	MdT
URM4552	101,4	C	92,30	C	79,06	C	45,72	T	84,20	C

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

² Classificação Toxicológica: MT = Muito tóxico; T= tóxico; MdT = moderadamente tóxico; C = compatível.

Andaló *et al.* (2004) mostraram que o imidaclopride foi compatível com *B. bassiana*, o mesmo tendo sido demonstrado por Moino Jr & Alves (1998) ao testarem *B. bassiana* e *M. anisopliae*, Neves *et al.* (2001) e Batista Filho *et al.* (2001) classificaram o inseticida como moderadamente compatíveis para *B. bassiana*.

Batista Filho *et al.* (2001) avaliaram o efeito fungitóxico do inseticida Decis 25 CE sobre *B. bassiana*. Os resultados mostraram que o produto químico é altamente tóxico (incompatível), apresentando uma alta ação inibitória sobre a esporulação do entomopatógeno. Estes dados discordam parcialmente dos dados obtidos neste experimento, no qual o inseticida foi classificado como compatível para a maioria das linhagens testadas, excetuando-se *B. bassiana* URM2921 e URM4551.

Quanto ao inseticida K-otrline SC 25, somente a linhagem *B. bassiana* URM2921 mostrou-se incompatível. Resultados semelhantes foram observados por Batista Filho *et al.* (2001) ao estudarem a compatibilidade do princípio ativo deste inseticida com linhagens de *B. bassiana* em duas concentrações, utilizando as recomendações máximas e mínimas para uso no campo, classificando-o como incompatível.

Os inseticidas Decis 25 CE e K-otrline SC 25, apesar de pertencerem ao mesmo grupo químico (deltametrina), comportaram-se diferentemente para as linhagens de *B. bassiana* URM2926 e URM4551. Decis foi compatível e tóxica, respectivamente, para as linhagens enquanto K-otrline foi moderadamente tóxica e compatível. De acordo com Tamai *et al.* (2002), produtos comerciais formulados com a mesma molécula química, mas pertencentes a fabricantes diferentes, podem apresentar comportamentos distintos. Além disso, o tipo de formulação também pode interferir no crescimento do entomopatógeno. Anderson & Roberts (1983) observaram que as formulações do tipo CE (concentrado

emulsionável) estão freqüentemente associadas com a inibição da conidiogênese em linhagens de *B. bassiana*.

A associação de extratos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas, reduzir custos e impactos ambientais. Hirose *et al.* (2001) estudaram o efeito da interação entre fungos entomopatogênicos e óleos de origem vegetal. Os autores observaram que a substância vegetal reduziu o crescimento e afetou significativamente a esporulação de *B. bassiana*, sendo classificado como muito tóxico. Estes resultados estão parcialmente de acordo com os obtidos neste trabalho para as linhagens *B. bassiana* URM2916, URM2921 e URM4551 que foram consideradas muito tóxicas.

Os inseticidas Quimióleo e Sevin apresentaram os maiores efeitos fungitóxicos sobre as linhagens testadas em relação aos outros defensivos agrícolas nas concentrações testadas. Estes resultados refletiram na sua incompatibilidade quando os dados do crescimento vegetativo e da esporulação foram submetidos à fórmula para determinação do valor de “T”. Entretanto, para Sevin, algumas linhagens foram classificadas como compatíveis. Isto porque a fórmula considera a esporulação como parâmetro maior, visto que o agente entomopatogênico infecta os insetos por meio dos esporos. Esse parâmetro teve seu desempenho menos afetado pelo inseticida neste trabalho, conforme os resultados referidos. Resultados similares foram obtidos por Batista Filho *et al.* (2003) ao avaliar os efeitos de inseticidas químicos sobre *B. bassiana* e *Nomurae rileyi*.

Pela análise dos valores de “T” para os defensivos, foi observado que produtos como Confidor e Decis apresentaram valores superiores a 100 quando associados às linhagens *B. bassiana* URM4552 e URM2926. Já para o produto K-otrhone os valores de “T”, para as linhagens *B. bassiana* URM2916, URM2923 e URM4551, ficaram próximos de 100, apresentando comportamento semelhante à testemunha. No caso desses produtos, sua

presença no meio teve efeito interativo positivo para esporulação dos fungos, o que não foi observado quanto ao parâmetro produção de conídios. Comportamentos semelhantes foram observados nos estudos de compatibilidade com outras linhagens de *B. bassiana* por Hirose *et al.* 2001, Neves *et al.* 2001, Mourão *et al.* 2003 e Oliveira *et al.* 2003.

Os resultados mostraram que as interações dos inseticidas com os fungos variaram de uma linhagem para outra e da natureza química do pesticida. Deltametrina e Imidaclopride foram os defensivos agrícolas que apresentaram os menores efeitos inibitórios sobre o crescimento micelial e a conidiogênese de *B. bassiana* quando em comparação ao grupo controle. Esses resultados estimulam o emprego desse fungo, em programas de Manejo Integrado de Pragas. Contudo, o pesticida azadiractina teve efeito negativo, sobre todas as linhagens analisadas, não sendo recomendado para programas de controle microbiano nos quais ocorra associação com essas linhagens fúngicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CENARGEN – EMBRAPA (Setor de Controle Biológico), pela concessão das linhagens de *B. bassiana* empregadas neste estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro à pesquisa.

Referências

- 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., 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.
- 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.
- Andaló, V., A. Moino Júnior, L. V. C. Santa-Cecília & G. C. Souza. 2004. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). Neotrop. Entomol. 33: 463-467.
- Anderson, T. E & D. W. Roberts. 1983. Compability of *Beauveria bassiana* strain with formulations used in Colorado potato beetle (Coleptera: Crhysomelidae) control. J. Econ. Entomol. 76: 1437-1441.
- Aragão, F.J.L., Vianna, G. R & E. L. Rech. 1998. Feijão transgênico – um produto da engenharia genética. Biotecnol. Biol. Desenvol. 1: 1-5.
- 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.
- Batista Filho, A., J. E. M Almeida & C. Lamas. 2001. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. Crop Prot. 30: 437-447. 2003.

- 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, Arq. Inst. Biol. 70: 61-67.
- César Filho, E., E. J. Marques & R. Barros. 2002. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) Caterpillares. Sci. Agric. 59: 457-462.
- Cruz, I. 2002. Controle biológico em manejo integrado de pragas. p.543-570. In: Parra, J. R. P; P. S. M. Botelho, B. S. Corrêa-Ferreira & J. M. S. Bento (eds.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, 635p.
- Dal Bello, G., S. Padin, C. L. Lastra & M. Fabrizio. 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. J. Stored. Prod. Res. 37: 77-84.
- Euclides, R. F. 1985. Manual de utilização do Programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas). Viçosa, (At! Jr.falta o nome da editora)59p, versão 5.0.
- Faria, M. & S. P. Wraight. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Prot. 20:767-778.
- Figueirêdo, 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) (Lepidoptera: Castniidae). Neotrop. Entomol. 31:397-403.
- Giustolin, T. A., J. D. Vendramin, S. B. Alves & S. A. Vieira. 2001. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. Neotrop. Entomol. 30:417-421.
- Hirose, E.; P. M. O. J. Neves, J. A. C. Zequi, L. H. Martins, C. H. Peralta & A. Moino Jr. 2001. Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic fungi *Beauveria*

- bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. 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 Junior, 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., Monteiro, A.C., Pereira, G. T. 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). Cien. Rural. 34:1675-1680.
- Malo, A. R. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. Rev. Colomb. Entomol. 19:151-158.
- Melo, I. S. & J. L. Azevedo. 2000. Controle biológico. Jaguariúna, EMBRAPA Meio Ambiente, 388p.
- Moino Júnior, A & S. B. Alves. 1998. Efeito de idacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An. Soc. Entomol. Bras. 27: 611-619.
- Mourão, S. A., E. F. Vilela, J. C. Zanuncio, L. Zambolim & E. S. Tuelher. 2003. Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Neotrop. Entomol. 32:103-106.

- Neves, P. M. O. J. & S. B. Alves. 2004. Eventos externos relacionados aos processos de infecção de *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) pelos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Neotrop. Entomol. 33:51-56.
- Neves, P. M. O. J. E. Hirose, P. T. Tchujo & A. Moino Júnior. 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotrop. Entomol. 30:263-268.
- Purwar, 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.
- Oliveira, C. N., Neves, P. M.O.J., Kawazoe, L. S. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. Sci. Agric. 60: 663-667.
- Oliveira, R. C., P. M. O. J. Neves & L. F. A. Alves. 2004. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). Neotrop. Entomol. 33:347-351.
- Quintela, E. D. & C. W. MacCoy. 1998. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. J. Econ. Entomol. 91:110-122.
- Quintela, E. D. & E. Ferreira. 2006. 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%20do%20Feijoeiro/agrot%C3%B3xicos.htm) > .
- Reis, R. C. S., D. R. Melo, E. J. Souza & V. R. E. P. Bittencourt. 2001. *In vitro* action of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. on

- the nymphs and adults of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1887) (Acari: Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53: 544-547.
- Samuels, R. I. & D. L. A. Coracini, 2004. Seleção de isolados *Beauveria Bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Blissus antillus*. Sci. Agric. 61:271-275.
- Silva, M & E. Espósito. 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental, p337-378. In: , E. Espósito & J. L. Azevedo (orgs). Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, EDUCS, 470p.
- Stonel, L. F., Sartorato, A. 1994. O cultivo do feijão: recomendações técnicas. Goiânia, EMBRAPA/CNPAP (Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária do Arroz e do Feijão), 28p.
- Tamai, M. A., Alves, S. B., Lopes, R. B., Faion, M & L. F. L. Padulla, 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq. Inst. Biol. 69: p.89-96.
- 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., Gonçalves, R. A., Santos, J. P., Cabral, L. C. & D. S. Santos. 2001. Controle de *Zabrotes subfasciatus* B. (Coleoptera: Bruchidae) em todas as fases do desenvolvimento pela atmosfera controlada com CO₂ e N₂, em feijão. Rev. Bras. Armaz. 26: 3-9.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Capítulo I

- Todas as linhagens selecionadas são altamente patogênicas, independente da concentração conidial inoculada sobre os insetos-alvo;
- As linhagens URM2921, URM2926, URM2923, URM4544 e URM4551 foram consideradas as mais eficientes para utilização em programas de controle biológico;

Capítulo II

- Os marcadores moleculares ISSR, (GTG)₅ e (GACA)₄, foram eficientes em demonstrar a variabilidade genética intraespecífica das linhagens de *Beauveria bassiana*.

Capítulo III

- A linhagem URM2923, independente do inseticida utilizado, apresentou melhor desempenho no parâmetro crescimento vegetativo;
- Independente da linhagem avaliada, o produto K-otrhone foi, dentre os inseticidas, o que apresentou maior efeito interativo positivo;
- A linhagem URM2921 foi a mais sensível aos efeitos tóxicos dos defensivos agrícolas testados, não sendo recomendada para programas de MIP, na formulação e concentração testada, para o controle de pragas do feijoeiro;

- O óleo vegetal (quimióleo) apresentou maior efeito fungitóxico, afetando o crescimento e a esporulação das linhagens de *B. bassiana*;
- As linhagens fúngicas apresentaram maior compatibilidade com os produtos químicos Decis e K-otrhone, podendo incluí-los em programas de MIP com os patógenos.

Anexos

Capítulo I – Normas para submissão do artigo no *Journal of Stored Products Research*

Guide for Authors

The *Journal of Stored Products Research* provides an international medium for the publication of both reviews and original results from laboratory and field studies on stored products. These include raw and semi-processed foods, animal feedstuffs, and a range of other durable items, including materials such as textiles or museum artefacts.

Suitable subjects include:

- the biology, ecology, physiology, behaviour, taxonomy, genetics and control of pests and spoilage agents
- relevant biotechnology, pest management and decision support systems
- the physical and chemical nature of the stored products and their environment, including their modification
- the assessment, prevention and control of losses
- regulatory, technological and economic subjects relevant to stored products
- the design and structure of the storage environment

Preparation of manuscripts

General: Manuscripts, in English, must be typewritten, double-spaced with wide margins. Good quality typescripts with a font size of 12 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Text: Manuscripts in general should be organized in the following order: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion), Acknowledgements, Appendix, References, Figures, Figure Captions and then Tables. A very brief summary or conclusion may be included after the Discussion, but it should neither replace nor repeat the Abstract. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. Please also supply five key words (or short phrases).

The technical description of methods should be given in detail only when such methods are new. SI units, and abbreviations, should be used throughout. Any unusual or Greek letters must be clearly identified.

The international rules of nomenclature should be used for all organisms. Full species names including the authority (e.g. *Acanthoscelides obtectus* (Say)) should be given the first time that an organism is mentioned in the main body of the paper, but authorities are not required in the Abstract. Authorities for the names should be given in full except in the cases of Linnaeus and Fabricius, which may be abbreviated to L. and F. respectively. Other than at the beginning of a sentence names may subsequently be abbreviated, (e.g. to *Acanthoscelides obtectus* or to *A. obtectus*) where no ambiguity may arise. Common names should be avoided in the title.

Common names of pesticides, which have been accepted by the International Standards Organisation (ISO), should be used wherever possible. In other situations a name used by a renowned national body (Entomological Society of America, INRA, etc.) should be used. The full chemical name of pesticides, which lack an ISO name, should be given when the compound is first mentioned. Trade names for active ingredients are preferable to those for particular formulations.

Numbers should be written in full where they occur at the beginning of a sentence and where they are not associated with units (thus: Ten beetles in 5 months). The following symbols and abbreviations should be used as appropriate; minutes (min), days (d), hours (h), moisture content (m.c.), relative humidity (r.h.), active ingredient (a.i.). When using any abbreviation (except % and °C) leave a single space between the numeral and following character. Avoid fractions. Manuscripts which include large numbers of formulae or equations should be accompanied by a separate sheet of nomenclature in which abbreviations or terms are explained or defined; there is then no need to repeat the explanations in the text, Tables or Figure legends. Data should be subjected to appropriate statistical analysis. Authors should provide the outcome in the form of the calculated statistic (values of t , χ^2 , F , etc), the number(s) of degrees of freedom (df) which may be presented as subscripts where appropriate, and the value of P which is appropriate (e.g. ANOVA: $F_{1,11}=7.89$, $P=0.017$). In cases where sample sizes are appropriate, as opposed to df , these should be given after the test statistic but before the value of P (e.g. Wilcoxon signed-ranks test: $T=6$, $N=14$, $P<0.01$). Note that the letters indicating calculated statistics such as standard error (of the mean) (SE), standard deviation (SD) and P should all be in

capital italics; Student's *t* is a specific exception to the capitalisation rule. *P* values for significant outcomes should be quoted as below a threshold significance value (e.g. $P < 0.05$, 0.01, 0.001) or as an exact probability value. Departure from a significance threshold of 0.05 should be stated and justified in the Methods. Non-significant outcomes should be indicated as NS (not italicised) or exact probability values, not as $P > 0.05$. State whether a test is one-tailed or two-tailed. Manuscripts lacking a satisfactory account of the analysis will be returned for revision.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that..." or "This is in the agreement with results obtained later (Kramer, 1994)"). For three or more authors use the first author followed by "et al.", in the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. Please note that all journal titles should be given in full. Anonymous publications should be cited as Anonymous (with the year of publication) in the text and included in the list of references as Anonymous (not Anon.). To enable readers to find sources effectively, references to conference proceedings should include the editors of the proceedings, the title of the proceedings and full name of the conference, its date and location, the publishers of the proceedings and their location. The titles of books and conference proceedings should be capitalised. Reference to internal reports of organisations, which have a narrow circulation, should be avoided as far as possible. Papers or books with titles in a foreign language must have an accurate English translation of the title in addition to the title in the original language (except where the language has a non-Roman alphabet, in which case a translation alone is acceptable with the original language clearly indicated).

References should be given in the following form:

Journal Article:

Perez-Mendoza, J., Hagstrum, D.W., Dover, B.A., Hopkins, T.L., Baker, J.E., 1999. Flight response, body weight, and lipid content of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) as influenced by strain, season and phenotype. *Journal of Stored Products Research* 38, 183-195.

Edited book:

Cardona, C., Karel, A.K., 1990. Key insects and other invertebrate pests of beans. In: Singh, S.R. (Ed), *Insect Pests of Tropical Food Legumes*. Wiley, Chichester, pp. 157-191.

Book:

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academy Press, Sydney.

Conference proceedings:

Winks, R.G., Hyne, E. A., 1994. Measurement of resistance to grain fumigants with particular reference to phosphine. In: Highley E., Wright, E.J., Banks, H.J., Champ, B.R. (Eds), *Stored Products Protection. Proceedings of the Sixth International Working Conference on Stored-product Protection*, 17-23 April 1994, Canberra, Australia, CAB International, Oxford, UK, pp. 244-249.

Abstracts: All papers and short communications must be provided with a brief abstract of *less than 300 words*.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Drawn tables, from which prints need to be made, should not be folded.
4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text but their approximate position indicated.
6. Each table should have a brief legend enabling it to be understood without immediate reference to the text. Any additional information essential to the understanding of the table should be given as a footnote below the table. Latin names of organisms should not be abbreviated in the legends.
7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. The first letter of each heading should be capitalised. Standard abbreviations of units of measurement should be added in parentheses.
8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps its reproduction at the best possible standard, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Always supply high-quality printouts of your artwork, in case conversion of the electronic artwork is problematic.
- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial (preferred), Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations (Figs) according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide legends to illustrations separately. Each Figure should have a brief and self-explanatory title. Latin names of organisms should not be abbreviated in legends.
- Produce images near to the desired size of the printed version. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PIC, WPG) the resolution is too low ;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Colour illustrations

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Electronic Submission

Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs.

General points

We accept most wordprocessing formats, but Word or WordPerfect is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety.

Word processor documents

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but

prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Capítulo II – Normas para submissão do artigo no Canadian Journal of Microbiology

The *Canadian Journal of Microbiology* (Can. J. Microbiol.) is a widely subscribed-to international journal of general microbiology and publishes **articles**, **notes**, **minireviews**, **reviews**, and **letters** in English or French. **Articles** are reports of research in any field of

microbiology and must be original new contributions to science. Notes may be brief reports of work that is largely confirmatory, advances in knowledge arising as by-products of broader studies, or descriptions of research techniques or developments in instrumentation. **Notes** should not be longer than 15 manuscript pages (about 4 printed pages). They should have an Abstract but should not be divided into Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion sections. **Minireviews** are brief, stimulating commentaries of limited scope that provide a novel synthesis or appraisal of research results or theories. They should be written in a style suitable for a general rather than a specialist readership, should not exceed 2–6 printed pages, should possess an abstract, and may or may not have section headings. Like minireviews, **reviews** should be focused and of general, current interest, but they provide a somewhat more comprehensive, although not exhaustive treatment. Both types of review should contain a carefully selected bibliography and both are subject to the usual editorial process (see below). **Letters** provide a forum for points of view or opinions on topical microbiological matters or on issues raised in papers that have been published in the *Canadian Journal of Microbiology*. These letters should be less than 500 words and contain no illustrations and no more than five references. They are reviewed by the Editorial Board but do not undergo the normal review process. Letters that take issue with published papers will be faxed to the author of the paper concerned with an invitation to reply. Upon receipt of that reply, both letters will be either approved and published together, or rejected.

Purpose of these instructions

To **facilitate publication**, authors must check symbols, abbreviations, and technical terms for accuracy, consistency, and readability. NRC Research Press maintains the right to preserve the technical quality of the Journal. Authors are requested to refer to a recent issue of the Journal for details of layout, especially for tables and reference lists. **Manuscripts and illustrations must meet the requirements outlined below; otherwise, publication may be delayed.**

Contact information

The contact information of the Journal is as follows: Editorial Office,

Canadian Journal of Microbiology, Room 5E14

College of Agriculture, University of Saskatchewan, 51 Campus Drive

Saskatoon, SK S7N 5A8 Canada

Tel: 306-966-6879 Fax: 306-966-6949, E-mail: cjm.journal@usask.ca

Submission of manuscripts

All manuscripts, whether new submissions or revised versions, are to be submitted electronically using the OSPREY Online Submission and Peer Review system (<http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cjm/osprey>). OSPREY is best viewed in Netscape 7.0 or higher or Internet Explorer 6.0 or higher. Authors may register at any time on the site, but should register only once. During registration, authors choose a username/ password. The security of manuscripts is protected by the username/password system.

For technical support at any point during submission, contact Louis Lafleur (613-998-9432; louis.lafleur@nrc-cnrc.gc.ca) from 8:30 am to 4:00 pm EST. A user manual with full instructions is available on the Web site. Authors must submit at least a cover letter and manuscript; tables and figures may be included in the manuscript file, or may be uploaded separately. OSPREY accepts files in most common text and graphics formats (see the complete list of formats on the Web site at http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/rp/rp2_prog_e?cjm_graphics_e.html).

Research Press is not currently accepting MS Word 12 documents (.docx extension). Please note that saving .docx documents to other formats (i.e., .doc, .rtf, or .txt) will likely lead to changes to or losses in formatting or other data. Authors saving .docx manuscripts to other formats are requested to check their manuscripts carefully before submission for any losses or other errors. When first submitting a manuscript for peer review, low-resolution versions of figures should be uploaded to limit file size. When submitting, authors should be working at a computer where all of the relevant files for their paper are available. Submission of a typical manuscript requires about 10 minutes, but upload time depends on the speed of the Internet connection. All

correspondence about manuscripts submitted through OSPREY will be sent to the person clearly listed as the corresponding author during submission. Correspondence is by e-mail.

For revisions, the corresponding author will be contacted by e-mail and asked to submit a revision; the process is very similar to initial submission. For accepted manuscripts, the author will be contacted to advise him or her of acceptance, and to ask him or her to upload, via OSPREY, the final accepted manuscript and all associated files for tables, figures, and supplementary material. The text and tables of the final accepted manuscript must be submitted in a word-processing format.

Once the manuscript is accepted, to ensure the highest possible quality reproduction and printing of figures, authors should:

- (i) Upload figure files separately from the manuscript.
- (ii) Ensure that figure files are high resolution.
- (iii) Ensure that figures are in their original file format (i.e., PhotoShop, Adobe Illustrator, Excel, CorelDraw, SigmaPlot, etc.) rather than embedded in a Word document or converted to a derived format. However, if figures are in a format that NRC Research Press does not accept, high-quality high-resolution PostScript or PDF files are acceptable. Sending files in more than one format is fine; the publisher will use the format that will reproduce the best.
- (iv) Ensure that they are uploading the most recent, correct versions of the files.

Other information regarding submission

Cover letter

The corresponding author should send a cover letter with the submission that

- (i) states the type of paper being submitted (e.g., article, note, review, etc.),
- (ii) includes the full name and complete contact information (including e-mail and postal addresses) for all authors,

- (iii) warrants that the manuscript represents original work that is not being considered for publication, in whole or in part, in another journal, book, conference proceedings, or government publication with a substantial circulation (see Ethics section, Duplicate and prior publication),
- (iv) warrants that all previously published work cited in the manuscript has been fully acknowledged (see Publication process section, Permission to reproduce copyright material),
- (v) warrants that the manuscript is one of a kind, or part of a study or thesis from which other manuscripts may be generated,
- (vi) warrants that all of the authors have contributed substantially to the manuscript and approved the final submission (see Ethics section, Assurance of authorship),
- (vii) explains any real or perceived conflicts of interest (see Ethics section, Conflict of interest and disclosure),
- (viii) lists the names, addresses, telephone and fax numbers, and e-mail addresses of up to four persons who are qualified to act as referees.

Preprints

To facilitate the review process, the author(s) must also provide two **preprints** of any relevant papers that have been submitted, are in press, or have been recently published. This is especially important if such papers are referred to in the manuscript. To facilitate the review process, the author(s) must also provide copies of related manuscripts not already published, publications containing significant overlap with the submission, as well as a written explanation for the overlap (see Ethics section, Duplicate and prior publication).

Resubmitted manuscripts

Authors resubmitting a manuscript after previous rejection or withdrawal must indicate the manuscript number assigned to the previous submission and the Associate Editor who managed its evaluation. Resubmitted manuscripts are treated as new papers. An original and two complete copies must be submitted together with a letter outlining the precise disposition of all points raised during the previous evaluation.

Editorial process

Receipt of manuscripts

Receipt of each manuscript is acknowledged by e-mail to the corresponding author within three working days. The manuscript is read and examined for conformity to these *Instructions to Authors* by the technical editor. Failure to meet the criteria outlined may result in an “edit submission” task being assigned to the authors before the peer review process can proceed.

Correspondence policy

Authors, Institutional Directors, and Editorial Managers should note that it is the strict policy of the *Canadian Journal of Microbiology* to correspond only with the authors through the designated corresponding author of a paper. The Editor regards a submitted manuscript as a confidential document and seeks to ensure that the authors retain control of the reports obtained during the evaluation process.

Peer review and evaluation

The Editor assigns management of the peer review process to the Associate Editor responsible for the subject area of the paper. However, the Editor will return unreviewed those manuscripts that do not fall within the Journal’s scope or character and those that exceed the Journal’s guidelines for prior publication. Papers submitted for inclusion in Journal supplements are treated with the same rigor of review as articles in regular issues.

The Associate Editor selects a minimum of two reviewers selected for their knowledge of, and their experience in, the subject treated in the manuscript. Reviewers are invited, in confidence, to recommend on the suitability of the submission and provide comments for the authors and the Associate Editor. The Associate Editor retains full responsibility, however, for all decisions regarding the manuscript. Authors are invited to suggest reviewers who are competent to examine their manuscript, but the Associate Editor is not limited to such suggestions. Reviewers are informed that they have received privileged documents for assessment of scientific merit and are expected to provide reasonable arguments to support their evaluations. Identities of reviewers will not be released to authors without the written consent of the reviewer. The review process is

expected to be complete within eight weeks, but conflicting recommendations and other unpredictable events may cause some delay.

Recommendations for acceptance, revision, and rejection

Associate Editors and reviewers are asked to make one of four recommendations: accept, accept pending minor revision, accept pending major revision, do not accept. Reviewers may also advise that a paper is more suitable to a specialist or local journal. Except where remarks are professionally inappropriate, all reviewers' comments are sent to authors.

The decision to accept a paper is made primarily on scientific content. However, authors should recognize that unclear writing and (or) data presentation often contribute to the refusal of manuscripts. The decision to ask for revisions is made in light of the reviewers' comments and recommendations, and after evaluation by the Associate Editor. Authors are allowed 28 days to undertake revisions. Revised manuscripts that do not meet this deadline will be treated as new submissions and may be subject to further review. Papers requiring new experimental work or major rewriting will be rejected, and the authors may be encouraged to submit a new manuscript when the required amendments have been completed. Authors should attempt to meet all the objections raised by reviewers, especially where clarification is sought. Rejected manuscripts that are re-submitted after substantial revision will be treated as new submissions, assigned a new manuscript number, and subjected to a new round of peer review.

The final decision on acceptance or rejection is made by the Editor on the advice of the Associate Editor. This decision, together with any relevant reasons, will be communicated by e-mail from the Editor to the corresponding author. One copy of the original submission is retained by the Editor. In the case of papers that are not acceptable or are withdrawn, this manuscript and a copy of all reviews and correspondence are retained, for reference (in case of resubmission), for one year after the date of submission.

Publication process

The Editorial Office checks all accepted manuscripts for conformation to the *Instructions to Authors* and to ensure that all necessary paperwork, including a signed coyright form (see below), is present. Any areas that are identified as problematic will be addressed by the Editorial Office in consultation with the corresponding author. Once the Editorial Office has resolved any problems, the manuscript is forwarded to NRC Research Press in Ottawa for publication. The papers are prepared for publication by a professional copy editor responsible for ensuring that the final printed work is consistent in form and style.

Once the paper has been accepted, all correspondence should be with NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON K1A 0R6, Canada (fax: 613-952-7656; e-mail: pubs@nrc-cnrc.gc.ca; URL: <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca>). NRC Research Press may make editorial changes as required, but will not make substantive changes in the content of a paper without consultation with the author and the Editors.

Galley proofs

A galley proof, illustration proofs, the copy-edited manuscript, and a reprint order form are sent to the corresponding author. **Galley proofs must be checked very carefully, as they will not be proofread by NRC Research Press**, and must be returned within 48 hours of receipt. The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions, and the cost of changes introduced at the proof stage and deemed to be excessive will be charged to the author. Questions concerning galley proofs should be addressed to Jacqueline Costigan (tel: 613-993-9038; fax: 613-952-7656; e-mail: jacqueline.costigan@nrc-cnrc.gc.ca).

Reprints

If reprints are desired, the reprint order form must be filled out completely and returned with payment (cheque, credit card number, purchase order number, or journal voucher) together with the corrected proofs and manuscript. Orders submitted after the Journal has been printed are subject to considerably higher prices. The Journal does not provide free reprints, and reprints are not mailed until a purchase order number or payment is received.

Permission to reproduce copyright material

Whenever a manuscript contains material (tables, figures, charts, etc.) that has been previously published and, hence, is protected by copyright, it is the obligation of the author to secure **written permission from the holder of the copyright** to reproduce the material **for both the print and electronic formats**. These letters must accompany the submitted manuscript.

Copyright assignment or license

All authors are required to complete a copyright assignment or license form assigning or licensing rights to the National Research Council of Canada. Most authors will sign the assignment form, which transfers all rights to NRC. Employees of the government in Commonwealth countries will sign a license form that allows them to retain Crown copyright, and employees of the US government will sign a form agreeing to publication, since no US copyright exists. Copyright assignment and license forms are available in the first issue of each volume, or on the Web site of the Journal (http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/rp/rptemp/copyright_e.pdf). When authors are informed that their manuscript has been accepted pending minor or major revision, they will also be given instructions as to how to complete and return the copyright form. These forms must be returned when the revised manuscript is resubmitted. Failure to return the copyright form at that time will result in unnecessary delays in the publication process and may require that the manuscript be withdrawn.

Permission to reprint material published in NRC journals

Requests for permission to reproduce or republish the paper, in whole or in part, should be sent to NRC Research Press, Roxanne Landriault (tel.: 613-990-2254; e-mail: roxanne.landriault@nrc-cnrc.gc.ca).

Ethics

The ethical standards expected of authors, referees, and editors are described in the NRC Research Press Publication Policy (on the Journal Web site at http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/rp/rp2_cust_e?pubpolicy, or available upon request).

Duplicate and prior publication

The Editorial Board considers a paper not eligible for publication if most of the content of the paper (i) is under consideration for publication or is published in a journal, or book chapter; (ii) is under consideration for publication or is published in a conference proceedings or a government publication, with a substantial circulation (distributed to 100 or more individuals over a wide area). Authors may place a draft of a submitted article on their Web site or their organization's server, provided that the draft is not amended once accepted for publication. We encourage authors to insert hyperlinks from preprints to the final published version on the NRC Research Press Web site (<http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca>). Abstracts or extended abstracts related to conferences do not constitute prior publication. Extended abstracts are usually under 2000 words and do not include presentation of detailed tables and graphics of the results of the study.

Assurance of authorship

In the cover letter, the corresponding author must affirm that all of the authors have contributed substantially to the manuscript and approved the final submission. In addition, the corresponding author should ensure that all individuals listed as authors have made a substantive creative contribution to the work. Clerical or mechanical contributions or provision of financial support are not grounds for ascribing authorship but may instead be acknowledged in the Acknowledgement section of the manuscript. Conversely, all those, regardless of status, who have made a creative contribution to the generation or analysis of the data are entitled to authorship.

Conflict of interest and disclosure

The Editor recognizes that authors and peer reviewers may have real or perceived conflicts of interest arising from intellectual, personal, or financial circumstances of their research. Submitted manuscripts should include full disclosure of funding sources for the research and the letter of transmission should include an explanation of any real or perceived conflicts of interest that may arise during the peer review process. Failure to disclose such conflicts may lead to refusal of a submitted manuscript.

Experiments involving humans or animals

All authors, regardless of their country of origin, who describe experiments on animals are required to give assurance in the **Materials and methods** that the animals were cared for in accordance with guidelines such as the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (Vol. 1, 2nd ed., 1993, and Vol. 2, 1984, available from the Canadian Council on Animal Care, Constitution Square, Tower 2, Suite 315, 350 Albert Street, Ottawa, ON K1R 1B1, Canada, or on their Web site at <http://www.ccac.ca>) or the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996, published by National Academy Press, 2101 Constitution Ave. NW, Washington, DC 20055, USA) and that their use of animals was reviewed and approved by the appropriate animal care review committee at the institution(s) where the experiments were carried out.

Authors who describe experiments on humans are required to provide assurance **in the manuscript** that appropriate standards for human experimentation have been followed, that the experiment has been reviewed and approved by their institution's ethics review committee, and that the subjects have given informed consent prior to participating in the study.

Photos of people and photo manipulation

If a person pictured in a photo is identifiable, his or her permission is required to publish the photo. The person will be asked to sign a letter or form allowing NRC Research Press to publish the photo.

Authors should be aware that the Journal considers digital images to be data. Hence, digital images submitted should contain the same data as the original image captured. Any manipulation using graphical software should be identified in the methods, including both the name of the software and the techniques used to enhance or change the graphic in any way. Such a disclaimer ensures that the methods are repeatable and ensures the scientific integrity of the work. The removal of artifacts or any (nonintegral) data held in the image is discouraged.

The manuscript

The manuscript should be typewritten, **double-spaced**, on paper 8.5 in. × 11 in. (or ISO A4). Typing should be on one side of the page only. Each page should be numbered, beginning with

the title page. In addition, each line of the manuscript should be numbered, beginning with the title page. For material that is to be set in italics, use an italic font; do not underline. Use capital letters only when the letters or words should appear in capitals. All manuscripts should contain a **title page** (p. 1), an **abstract** (p. 2), followed by **Introduction** (p. 3), **Materials and methods**, **Results**, **Discussion**, and **Acknowledgements** sections, plus references, tables, figure captions, and appendices, in that order. (See descriptions of each part of the manuscript, below.) Tables and captions for illustrations should be on separate pages. The Journal accepts manuscripts written in either English or French. However, it is expected that the manuscript be clearly and concisely written, using proper grammar. If authors are unsure if the written manuscript will meet minimal acceptable standards, they are urged to consult a colleague fluent in English or French, or utilize the services of a professional editor. Revision of manuscripts solely for editorial or language-related reasons frequently results in unnecessary delays in the publication process.

Title

Both titles and abstracts provide information for contemporary **alerting and information retrieval** services, and should therefore be informative but brief. Limit the title to what is documented in the manuscript. It is the key to the article and should clearly and concisely reveal what appears in the paper itself. The title allows the reader to judge whether the article is of potential interest and to judge the scope and potential importance of the article. Words in the title should convey a maximum amount of information and identify the nature of the research, organism used, and where appropriate, the technical approach (e.g., X-ray, chromatography, mathematical analysis). Good titles greatly assist scientists and librarians in using scientific literature and aid indexers in preparing titles for keyword indexes. Series titles should be avoided.

Title page

The **title page** should contain the following. (i) The full title of the paper. (ii) Authors listed in the order in which they are to appear at the head of the printed article. (iii) Affiliation and address (including e-mail address) for each author. This should reflect the affiliation and address at the time of the study. Indicate current affiliations and addresses (including e-mail addresses) that

differ from those in the by-line in a footnote. (iv) Name, address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author responsible for correspondence.

Abstract

An abstract is required for every contribution and should contain accurate descriptive words that will draw the reader to the content. This is particularly important because contemporary alerting services and search engines will search this text. It should not be more than 200 words and should appear on a separate page. The concise abstract should present the paper content accurately and should supplement, not duplicate, the title in this respect. Abstracts will be translated into the other official language by the journal translator. Authors able to submit abstracts in both fluent English and French are encouraged to do so.

Key words

Key words should not exceed 3–5 and should be placed directly below the abstract.

Text

The **text** should be written and arranged to ensure that the observations reported may be reproduced and (or) evaluated by readers. Sources of biological materials, experimental methods, geographical locations, and statistical methods should be described. Sources of commercially available laboratory or field equipment and fine chemicals should be indicated in parentheses; list the company name, city, and country. Authors are encouraged to include uniform resource locators (URLs) and digital object identifiers (DOIs) to enable readers to find material on the Web. URLs and DOIs for references cited should be placed after the reference in the reference list; other URLs and DOIs should be placed in context in the text.

Introduction

Limit the introduction largely to the scope, purpose, and rationale of the study. Restrict the literature review and other background information to that needed in defining the problem or setting the work in perspective. An introduction generally need not exceed 375–500 words.

Materials and methods

The **degree of reproducibility of experiments** should be indicated either in general statements in **Materials and methods** and **Results** or, preferably, as statistical treatments of numerical data cited in tabular or graphic form. The **experimental**, or **computational**, material must be sufficiently detailed to permit reproduction of the work, but must be concise and avoid lengthy descriptions of known procedures; the latter should be specified by appropriate references. Identify figures that have been digitally enhanced or modified, and provide the software and technique used.

Results

Limit the results to answers to the questions posed in the purpose of the work and condense them as comprehensively as possible. Material supplementary to the text can be archived in the report literature or a recognized data depository and referenced in the text (see Supplementary material section). Authors of manuscripts reporting nucleic acid sequences must submit the relevant data to an appropriate database. The accession number assigned to the deposited sequence must be provided in the manuscript. Information regarding depositing of sequence data may be obtained by contacting the relevant database as follows:

Discussion or conclusion

Limit the Discussion to giving the main contributions of the study and interpreting particular findings, comparing them with those of other workers. Emphasis should be maintained on synthesis and interpretation and exposition of broadly applicable generalizations and principles. If the Discussion is brief and straightforward, it can be combined with the Results section.

Acknowledgements

Acknowledgements should be written in the third person and kept to a concise recognition of relevant contributions.

References

The author is responsible for verifying each reference against the original article. Each reference must be cited in the text using the surnames of the authors and the year, for example, (Walpole 1985) or Green and Brown (1990). Depending on the sentence construction, the names may or may not be in parentheses, but the year always is. If there are three or more authors, the citation should give the name of the first author followed by et al. (e.g., Green et al. 1991). If references occur that are not uniquely identified by the authors' names and year, use *a*, *b*, *c*, etc., after the year, for example, Green 1983*a*, 1983*b*; Green and Brown 1988*a*, 1988*b*, for the text citation and in the reference list. Uniform resource locators (URLs) or digital object identifiers (DOIs) are useful in locating references on the Web, and authors are encouraged to include these; they should be added to the reference in the reference list (see example below).

Unpublished reports, private communications, and In press references

References to unpublished reports, private communications, and papers submitted but not yet accepted are not included in the reference list but instead must be included as footnotes or in parentheses in the text, giving all authors' names with initials; for a private communication, year of communication should also be given (e.g., J.S. Jones (personal communication, 1999)). If an unpublished book or article has been **accepted for publication**, include it in the reference list followed by the notation "In press".

Presentation of the list

The **reference list** must be double-spaced and placed at the end of the text. References must be listed in alphabetical order according to the name of the first author and not numbered. References with the same first author are listed in the following order. (i) Papers with **one author only** are listed first in chronological order, beginning with the earliest paper. (ii) Papers with **dual authorship** follow and are listed in alphabetical order by the last name of the second author. (iii) Papers with **three or more authors** appear after the dual-authored papers and are arranged chronologically. If a reference has many authors, a minimum of six authors should be listed.

General guidelines on references

References should follow the form used in current issues of the Journal. The names of serials are abbreviated in the form given in the *List of Journals Indexed for MEDLINE* (National Library of Medicine, National Institutes of Health, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA; <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>). In doubtful cases, authors should write the name of the serial in full. The Journal encourages the inclusion of issue numbers, which should be placed in parentheses after the volume number. References to **nonrefereed documents** (e.g., environmental impact statements, contract reports) must include the address where they can be obtained. The following bibliographic citations illustrate the punctuation, style, and abbreviations for references.

Journal article

Redwood, R.G., and Jain, A.K. 1992. Code provisions for seismic design for concentrically braced steel frames. *Can. J. Civ. Eng.* **19**(9): 1025–1031.

Journal article available online only (with URL)

van der Sanden, J.J., and Hoekman, D.H. 2005. Review of relationships between grey-tone co-occurrence, semivariance, and autocorrelation based image texture analysis approaches [online]. *Can. J. Remote Sensing*, **31**(3): 207–213. Available from <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cjrs/rs3-05.html> [accessed 9 September 2005].

Journal article available online only (with DOI)

van der Sanden, J.J., and Hoekman, D.H. 2005. Review of relationships between grey-tone co-occurrence, semivariance, and autocorrelation based image texture analysis approaches [online]. *Can. J. Remote Sensing*, **31**(3): 207–213. doi:10.1139/rs03-011.

Entire issue of journal

Gordon, D.C., Jr., and Hourston, A.S. (*Editors*). 1983. Proceedings of the Symposium on the Dynamics of Turbid Coastal Environments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**(Suppl. 1).

Report

Sanders, W.W., Jr., and Elleby, H.A. 1970. Distribution of wheel loads in highway bridges. National Cooperative Highway Research Program Report 83, Transportation Research Board, National Research Council, Washington, D.C.

Book

Williams, R.A. 1987. Communication systems analysis and design. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.

Part of a book

Healey, M.C. 1980. The ecology of juvenile salmon in Georgia Strait, British Columbia. *In* Salmonid ecosystems of the North Pacific. *Edited by* W.J. McNeil and D.C. Himsworth. Oregon State University Press, Corvallis, Oreg. pp. 203–229.

Paper in conference proceedings

Kline, V.M., and McClintock, T. 1994. Effect of burning on a dry oak forest infested with woody exotics. *In* Proceedings of the 13th North American Prairie Conference: Spirit of the Land, Our Prairie Legacy, Windsor, Ont., 6–9 August 1992. *Edited by* R.G. Wickett, P.D. Lewis, A. Woodcliffe, and P. Pratt. Department of Parks and Recreation, Windsor, Ont. pp. 207–213.

Abstract

Waite, R.T., and Wood, D.O. 1991. Isolation of the *Rickettsia prowazekii* *gyrA* gene. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 91st, 1991. Abstr. D-160. p. 105.

Thesis

Wang, I.K. 1991. 6-Methylsalicyclic acid polyketide synthetase: enzyme purification and gene cloning. Ph.D. thesis, University of Calgary, Calgary, Alta.

In press

Brown, M.C., and Johnson, L.W. 1991. A new method of cell breakage. J. Gen. Microbiol. In press.

Letter

Romesburg, H.C., and Mohai, P. 1991. Letter. Can. J. For. Res. **21**: 1297–1298.

Electronic citation

Quinion, M.B. 1998. Citing online sources: advice on online citation formats [online]. Available from <http://www.worldwidewords.org/articles/citation.htm> [accessed 20 October 2005].

Citation including URL

Tremblay, R. 1998. Development of design spectra for long-duration ground motions from Cascadia subduction earthquakes. Can. J. Civ. Eng. **25**(6): 1078–1090. Available from http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/rp/rp2_abst_e?cjce_198-028_25_ns_nf_cjce6-98 [accessed 20 October 2005].

Citation including DOI

Tremblay, R. 1998. Development of design spectra for long-duration ground motions from Cascadia subduction earthquakes. Can. J. Civ. Eng. **25**(6): 1078–1090. doi:10.1139/L04-079.

Tables

Tables must be typed on separate pages, placed after the list of references, and numbered with Arabic numerals in the order cited in the text. The title of the table should be a concise description of the content, no longer than one sentence, that allows the table to be understood without detailed reference to the text. Column headings should be brief, but may be amplified by footnotes. Vertical rules should not be used. A copy of the Journal should be consulted to see how tables are set up and where the lines in them are placed. Footnotes in tables should be designated by symbols (in the order *, †, ‡, §, ||, ¶, #) or superscript lowercase italic letters. Descriptive material not designated by a footnote may be placed under a table as a **Note**.

Figure captions

Figure captions should be listed on a **separate page** and placed after the tables. The caption should informatively describe the content of the figure, without need for detailed reference to the text. Experimental conditions should not be included, but should be adequately covered in the Methods. For graphs, captions should not repeat axis labels, but should describe what the data show. A single caption can be provided for multipart (composite) figures, with necessary details on the separate parts, identified by their individual labels. If the separate parts require enough information to warrant separate captions, then the composite should be separated into individual figures.

Appendices

An appendix should be able to stand alone, as a separate, self-contained document. Figures and tables used in an appendix should be numbered sequentially but separately from those used in the main body of the paper, for example, Figure A1, Table A1, etc. If references are cited in an appendix, they must be listed in an appendix reference list, separate from the reference list for the article.

Supplementary material

Supplementary material (or data) consists of extra tables, figures (maps), detailed calculations, and data sets produced by the authors as part of their research, but not essential for understanding or evaluating the paper, and not published with the article in the print edition of the journal. This material is never edited, converted, or scanned, and therefore will appear exactly as submitted. This is to prevent any errors from being inadvertently introduced during file manipulation or printing. Tables and figures should be numbered in sequence separate from those published with the paper (e.g., Fig. S1, Table S1), and all supplementary material should be referred to in the manuscript by footnotes. Supplementary material must be submitted with the article, in electronic format, hard-copy format, or both. During Web submission (OSPNEY), relevant files should be attached under “Supplementary data”. For mail submission, it should be clearly marked as such. If an electronic copy is provided, it will be made available in its native file format on the Journal Web site (at no cost to readers). A copy of the electronic file(s) along with any hard copies of the

data will also be deposited in the Depository of Unpublished Data, CISTI, National Research Council of Canada, Ottawa, ON K1A 0R6. If an author wishes to have a hard copy deposited with the Depository of Unpublished Data, they must provide the hard copy. Copies of the material from the depository may be purchased by readers or subscribers.

Illustrations

One original and two copies of figures must be submitted to the Editorial Office, even if electronic versions are to be submitted for use in production. Each figure or group of figures should be planned to fit, after appropriate reduction, into the area of either one or two columns of text. The maximum finished size of a one-column illustration is 8.6 cm \times 23.7 cm (3.4 in. \times 9.3 in.) and that of a two-column illustration is 18.2 cm \times 23.7 cm (7.2 in. \times 9.3 in.). The figures (including halftones) must be numbered consecutively in Arabic numerals, and each one must be referred to in the text and must be self-explanatory. All terms, abbreviations, and symbols must correspond with those in the text. Only essential labelling should be used, with detailed information given in the caption.

Line drawings

All lines must be sufficiently thick (0.5 points minimum) to reproduce well, and all symbols, superscripts, subscripts, and decimal points must be in good proportion to the rest of the drawing and large enough to allow for any necessary reduction without loss of detail. Avoid small open symbols; these tend to fill in upon reproduction. **Lettering produced by dot matrix printers or typewriters, or by hand, is not acceptable.** The same font style and lettering sizes should be used for all figures of similar size in any one paper. Original recorder tracings of **NMR, IR, ESR spectra**, etc., are not acceptable for reproduction; they must be redrawn.

Photographs

Photographs should be continuous tone, of high quality, and with strong contrast. Only essential features should be shown. A photograph, or group of them, should be planned to fit into the area of either one or two columns of text **with no further reduction**. Electron micrographs or photomicrographs should include a scale bar directly on the print.

Colour illustrations

All **colour** files submitted must be as CMYK (cyan, magenta, yellow, and black). These colours are used in full-colour commercial printing. RGB graphics (red, green, and blue; colours specifically used to produce an image on a monitor) will not print correctly.

Colour illustrations will be at the author's expense. Further details on prices are available from Judy Busnarda, Managing Editor of the Journal (613-993-0994; fax: 613-952-7656; e-mail: judy.busnarda@nrc-cnrc.gc.ca).

Multimedia

Audio and video clips in the major multimedia formats are now accepted for NRC Research Press journals published in full-text HTML. For accepted formats, see the Electronic Graphic List at http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/rp/rp2_prog_e?cjm_graphics_e.html.

Preparation of electronic graphic files

General

NRC Research Press prefers the submission of electronic illustration files for accepted manuscripts and will use these electronic files whenever possible. If electronic files are not available or if those supplied are inadequate for reproduction, hard-copy originals of adequate quality, either previously supplied or requested from the author, will be scanned. Note that the scanner will easily reproduce flaws (e.g., correction fluid, smudges). Submission of noncontinuous (screened) photographs and scanned illustrations printed out on laser printers is not recommended, as moirés develop; a moiré is a noticeable, unwanted pattern generated by rescanning or rescreening an illustration that already contains a dot pattern. **If sending hard copies, please ensure that electronic files match the hard copies (i.e., figure number and figure content).** If sending a disk, on the disk label, identify (i) the software application and version and (ii) file name(s), size, and extension. If you have compressed your files, indicate what compression format was used. PC or Macintosh versions of True Type or Type 1 fonts should be

used. **Do not use bitmap or nonstandard fonts.** Electronic graphics can be accepted on the following disks: 3½" disks, 100 MB Zip cartridge, and CD-ROM.

The preferred graphic application of NRC Research Press is CorelDraw! For other applications that can be used, see the electronic graphics list at http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/rp/rp2_prog_e?cjm_graphics_e.html. All figures should be submitted at the desired published size. For figures with several parts (e.g., *a*, *b*, *c*, *d*, etc.) created using the same software application, assemble them into one file rather than sending several files.

Remember that the more complex your artwork becomes, the greater the possibility for problems at output time. Avoid complicated textures and shadings, especially in vector illustration programs; this increases the chance for a poor-quality final product.

Bitmap (raster) files — Bitmaps are image files produced using a grid format in which each square (or pixel) is set to one level of black, colour, or grey. A bitmap (rasterized) file is broken down into the number of pixels or picture elements per inch (ppi). Pixels per inch is sometimes referred to as dots per inch (dpi). The higher the resolution of an image, the larger the number of pixels contained within the rectangular grid. The proper resolution should be used when submitting bitmap artwork. The minimum requirements for resolution are 600 dpi for line art, 1200 dpi for finelines (line art with fine lines or shading), 300 dpi for halftones and colour, and 600 dpi for combinations (halftones with lettering outside the photo area).

Nomenclature

Microorganisms

Authors are required to use currently accepted names for microorganisms as indicated in *International Code of Nomenclature of Bacteria* in 1990. A new name is not validly published until a note containing the name is also published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microorganisms and viruses should be given strain designations consisting of letters (usually two) followed by serial numbers. It is generally advisable to use the worker's initials or a descriptive symbol of locate or laboratory. Each new isolate will then be

given a new (serial) designation (AB1, AB2, etc.). Genotypic and phenotypic symbols should not be included.

Bacteria

The use of genotypic and phenotypic designations should follow the recommendations of Demerec et al. (Genetics, **54**: 61–74, 1966). (i) Phenotypic designations must be used when mutant loci have not been identified or mapped. Phenotypic designations generally consist of three-letter symbols, not italicized, with the first letter capitalized. Superscript letters may be used (e.g., Str^s for streptomycin sensitivity). (ii) Genotypic designations are composed of three-letter locus symbols written in lower case italics. Wild-type alleles are indicated by positive superscripts (e.g., *his*⁺). If several loci control related functions, they are distinguished by italicized capital letters following the gene symbols (e.g., *hisA*, *hisB*). Mutation sites are indicated by putting the serial isolation numbers (allele numbers) after the locus symbol. Deviations from normal use should be defined. For more detailed information about the symbols in current use, consult reviews by Bachmann (Microbiol. Rev. **47**: 180–230, 1983) for *Escherichia coli* K-12; Sanderson and Roth (Microbiol. Rev. **52**: 485–532, 1988) for *Salmonella* spp.; and Henner and Hoch (Microbiol. Rev. **44**: 57–82, 1980) for *Bacillus subtilis*.

Viruses

In the genetic nomenclature of bacterial viruses (bacteriophages), no distinctions are made between genotype and phenotype. Genetic symbols may be one, two, or three letters.

Transposable elements and plasmids

Nomenclature of transposable elements (transposons, Mu) should follow Campbell et al. (Gene, **5**: 197–206, 1979), and for plasmids, should follow Novick et al. (Bacteriol. Rev. **40**: 168–189, 1976).

Enzymes

For enzyme nomenclature, *Enzyme Nomenclature (1992): Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Academic Press, San Diego, Calif.) should be followed.

Capítulo III – Normas para submissão do artigo no Neotropical Entomology

Instruções aos Autores

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

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 sequencialmente 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 (versaletes), 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 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).

----- Original Message -----

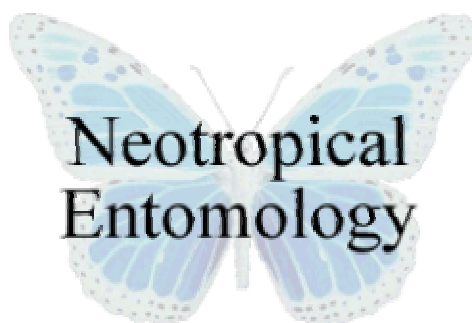
From: FRANCISCO BRAGA DA PAZ JÚNIOR

To: Manuscritos - Neotropical Entomology

Cc: Regina L. Sugayama - Neotropical Entomology

Sent: Tuesday, March 06, 2007 9:27 PM

Subject: Submissão de Trabalho



Novo Trabalho!

Envio do Trabalho efetuado em: 06/Mar/2007 - 9:27:47 PM

Nome: **FRANCISCO BRAGA DA PAZ JÚNIOR**

Instituição: **CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE PERNAMBUCO**

Departamento: **UNED PESQUEIRA**

Endereço: **Rodovia BR 232 km 214 - Pesqueira - PE**

Cidade: **RECIFE**

Estado: **PERNAMBUCO**

País: **BRASIL**

Código Postal: **55**

Telefone: **(81) 32233104/ 99591448**

E-mail: fbpjunior@cefetpesqueira.edu.br

Título: **Compatibilidade do fungo Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin com Inseticidas Químicos Visando o Controle do Caruncho do Caupi Callosobruchus maculatus (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae).**

Tipo: **Full Article**

Palavras Chave: **Fungo entomopatogênico, controle biológico, inseticidas, Vigna unguiculata, caupi.**

Autores: **Francisco B. da Paz Jr, Carlos F. R Guaraná, Eliana S. Lyra, Elza A. Luna-Alves Lima, João L. Azevedo**

Outros Autores:

Número de Páginas: **SIM**

Número de Tabelas: **SIM**

Número de Imagens: **SIM**

Descrição	Arquivo
	Paz_Júnior, F. B.doc