

EFEITOS DOS FATORES FÍSICOS E BIÓTICOS NA CONIDIOGÊNESE
E SOBREVIVÊNCIA DE *Beauveria bassiana* (BAIS.) VUILL.
NO INTERIOR DE CADÁVERES DE *Cerotoma arcuata*
(OLIVIER, 1791) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)¹

Paulo M. Fernandes²

Sérgio B. Alves³

Bonifácio P. Magalhães⁴

Donald W. Roberts⁵

ABSTRACT

Effects of physical factors on the conidiogenesis and survival of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. within cadavers of *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1791) (Coleoptera: Chrysomelidae).

Studies were conducted to determine the effects of combination of temperature ($17,5 \pm 1$, 24 ± 1 , and $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$) relative humidity (R.H.) (59 ± 5 , 72 ± 4 , 89 ± 3 , and $99 \pm 1\%$), and concentrations of inoculum (0, 10^7 , 10^8 and 10^9 conidia/ml) on the conidiogenesis and survival of *Beauveria bassiana* within cadavers of *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1791). Conidiogenesis was limited by high temperature and low R.H., and did not occur at 30°C and 72 or 59% R.H.. Conidia production on the insects was greatest at 24°C and not affected by the number of conidia applied. At $17,5^{\circ}\text{C}$ and 72% R.H. the fungus in 70% of the cadavers retained the ability to conidiate for 60 days.

Recebido em 21/3/89

¹ Parte da dissertação de mestrado em entomologia apresentada à ESALQ/USP. Pesquisa financiada através do convênio EMBRAPA/CNPAF/BOYCE THOMPSON INSTITUTE.

² Universidade Federal de Goiás - Escola de Agronomia, Caixa Postal 131, 74000 Goiânia-GO.

³ Departamento de Entomologia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP. Caixa Postal 09, 13400 Piracicaba-SP.

⁴ EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Caixa Postal 179, 74000 Goiânia-GO.

⁵ BOYCE THOMPSON INSTITUTE, Tower Road, Corn. University, NY - 18450 - USA.

RESUMO

Estudaram-se os efeitos de diferentes combinações de temperatura ($17,5 \pm 1$, 24 ± 1 e $30 \pm 1^\circ\text{C}$) umidade relativa (59 ± 5 , 72 ± 4 , 89 ± 3 e $99 \pm 1\%$) e concentrações de inóculo (10^0 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios/ml) na conidiogênese e sobrevivência de *Beauveria bassiana* no interior de cadáveres de *Ceratomyxa arcuata* (Olivier, 1791). A conidiogênese foi limitada por altas temperaturas ou baixas umidades relativas, não ocorrendo a 30°C e a 59 ou 72% de umidade. A produção de conídios sobre o inseto foi maior a 24°C , sendo pouco influenciada pela concentração de inóculo. A $17,5^\circ\text{C}$ e 72% de umidade relativa o fungo *B. bassiana* sobreviveu no interior de cadáveres de *C. arcuata* por 60 dias.

INTRODUÇÃO

A temperatura, umidade relativa e concentração de inóculo são importantes fatores que podem influenciar *Beauveria bassiana* e outros fungos entomopatogênicos desde a germinação até a conidiogênese e sobrevivência de estruturas reprodutivas. Entretanto, a maioria dos trabalhos trata do efeito isolado de cada fator e evidenciam apenas a importância da umidade relativa. Vários autores afirmam que o desenvolvimento micelial externo e a conidiogênese de *B. bassiana* após a morte do inseto somente ocorre em níveis de umidade relativa próximos a saturação (SCHAERFFENBERG, 1964; ROBERTS & YENDOL, 1971; FERON, 1977; RIBA & MARCANDIER, 1984; ALVES, 1986). RAMOSKA (1984) encontrou diferenças na produção de conídios de *B. bassiana* sobre cadáveres de *Blissus leucopterus* em diferentes umidades relativas. O número médio de conídios por inseto foi de $1,2 \times 10^5$ a 75% e $4,4 \times 10^6$ a 100% de umidade relativa.

Os efeitos da temperatura e da umidade relativa na longevidade de conídios de *B. bassiana* foram estudados por vários autores (CLERK & MADELIN, 1965; RIBA & MARCANDIER, 1984; DAoust & PEREIRA, 1986). Entretanto, nenhum destes autores aborda os efeitos destes fatores na sobrevivência de *B. bassiana* no interior do inseto recém-morto sob condições que impedem a conidiogênese.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar os efeitos simultâneos de diferentes temperaturas, umidades relativas e concentrações de inóculo na conidiogênese e sobrevivência de *B. bassiana* em cadáveres de *Ceratomyxa arcuata*, um importante desfolhador e vetor de víruses do feijão e caupi na América Latina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Goiânia (Goiás-Brasil), entre setembro de 1985 e abril de 1986.

Foi utilizado o isolado "CP-5" de *Beauveria bassiana* da coleção de entomopatógenos do CNPAF, obtido originalmente de *Cerotoma* sp. no Estado do Amazonas e adultos de *Cerotoma arcuata* (2ª e 3ª geração de Laboratório) com 3 a 8 dias de idade sob as seguintes condições em combinação:

- a) Temperatura (°C): $17,5 \pm 1$; $24,0 \pm 1$ e $30,0 \pm 1$.
- b) Umidade Relativa (U.R.) (%): 59 ± 5 , 72 ± 4 , 89 ± 3 e 99 ± 1 .
- c) Concentração de *B. bassiana* (conídios/ml): 0, 10^7 , 10^8 e 10^9 .

O controle de temperatura foi feito utilizando-se estufas incubadoras para BOD (marca FANEN) previamente reguladas e com escotofase de 24 horas. Para a regulação de U.R. foram utilizados frascos de vidro com capacidade para quatro litros, nos quais foram colocados 200 ml de água destilada ($99 \pm 1\%$ de U.R.) ou 200 ml de água destilada saturada com os seguintes sais para os demais níveis de U.R.:

- a) Sulfato de potássio - K_2SO_4 - P.A. - 25 g/200 ml de água destilada para $89 \pm 3\%$ de U.R.
- b) Cloreto de sódio - NaCl - P.A. - 55 g/200 ml de água destilada para 72 4% de U.R.
- c) Nitrato de magnésio - $Mg(N)_3)_2 \cdot 6 H_2O$ - 350 g/200 ml de água destilada para $59 \pm 5\%$ de U.R.

O registro de temperatura de U.R. no interior das câmaras de controle de U.R. foi feito utilizando-se um termohigrógrafo eletrônico (DATAPOD MODEL DP-200) programado para leituras a cada 30 minutos durante o período de duração do experimento.

O fungo foi produzido em placas de Petri com meio de cultura BDA+Y (batata - 200g; destrose - 12g; ágar - 22g e extrato de levedura (Y) - 4g) completando o volume com água para 1 litro de meio. O meio inoculado foi mantido a 26°C durante 15 dias, quando foi feita uma suspensão de conídios em água estéril mais o espalhante Tween 80 (0,1% V/V). Essa suspensão foi quantificada em hemocitômetro e através de diluição obtiveram-se as diferentes concentrações. A viabilidade dos coní-

dios foi de 100%, sendo determinada através de teste de germinação em BDA + Y a 26°C com leitura após 20 horas.

Os insetos utilizados foram criados em laboratório sobre folhas e plântulas de caupi (*Vigna unguiculata*). Foram feitos 48 tratamentos com quatro repetições de nove insetos e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Cada grupo de nove insetos foi pulverizado com 0,5 ml de suspensão de conídios e mantido em gaiola de arame telada. Em cada câmara de controle de U.R. foram colocadas quatro gaiolas com insetos pulverizados com as diferentes concentrações, fixadas a um suporte de isopor com quatro faces de modo a evitar contato entre as gaiolas.

O alimento (fatias de taiuiá - *Ceratosanthes hilariana* Cogn. - Cucurbitaceae) foi trocado diariamente. Utilizou-se este alimento por ser bem aceito pelos insetos e resistente ao ressecamento em U.R. menores.

Após 10 dias, quando a maioria dos insetos estava morta, foi feita uma avaliação dos níveis de conidiogênese. Nas combinações de condições que permitiram a conidiogênese, os insetos foram mantidos por mais 10 dias. Em seguida foram retirados e colocados em tubo de ensaio com 10 ml de água mais espalhante adesivo. Após intensa agitação as suspensões obtidas foram quantificadas em hemocitômetro, obtendo-se o número médio de conídios produzidos por inseto em cada tratamento.

Nas combinações de condições que não permitiram a conidiogênese, os insetos mortos de cada repetição de um mesmo tratamento foram reunidos e mantidos nas mesmas condições por mais 60 dias. Eliminaram-se os cadáveres de corpo escuro, flácidos e exalando odor desagradável, pois provavelmente estavam colonizados por bactérias. Foram feitas amostragens aos 0, 10, 30 e 60 dias. Cada amostra que era composta de oito insetos, foi colocada em câmara úmida (Placa de Petri com papel filtro úmido) e mantida a 25°C durante cinco dias quando foi feita a contagem do número de insetos com sinais externos do fungo.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e o teste Tukey foi utilizado na comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de *C. arcuata* sob diferentes combinações de fatores são apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 - Conidiogênese de *Beauveria bassiana* sobre cadáveres de *Ceratomyia arcuata** sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios. EMBRAPA/CNPAF, 1986.

Umidade Relativa (%)	Concentração de inóculo (conídios/ml x 10 ⁷)	Porcentagem de insetos com sinais externos do fungo (conidiogênese)		
		Temperatura (°C)		
		17,5 ± 1	24 ± 1	30 ± 1
99 ± 1	0	0	0	0
	1	72,2	53,0	0
	10	72,2	61,0	7
	100	77,1	74,9	0
89 ± 3	0	0	0	0
	1	77,8	58,3	0
	10	71,4	57,1	0
	100	83,3	80,5	0
72 ± 4	0	0	0	0
	1	0	0	0
	10	0	0	0
	100	0	0	0
59 ± 3	0	0	0	0
	1	0	0	0
	10	0	0	0
	100	0	0	0

(*) 28 a 36 insetos adultos avaliados por tratamento.

A conidiogênese foi limitada por alta temperatura e umidades relativas baixas. Praticamente não ocorreu conidiogênese na temperatura de 30°C para todos níveis de umidade relativa e nas umidades mais baixas (72 e 59%) para as três temperaturas. Nas combinações de altas umidades relativas (99 a 89%)

e temperaturas mais baixas (24 e 17,5°C) e porcentagem de cadáveres com conidiogênese variou de 53,0 a 83,3% entre as concentrações. Houve tendência de uma maior porcentagem de cadáveres com conidiogênese na temperatura mais baixa (17,5°C) ou na concentração mais alta (10^9).

Em relação à influência da umidade relativa no desenvolvimento micelial e conidiogênese de *B. bassiana* sobre o cadáver, estes resultados confirmam os dados obtidos por diversos autores (SCHAERFFENBERG, 1964; FERRON, 1977; RIBA & MARCANDIER, 1984). Estes autores mostraram que a conidiogênese sobre o cadáver ocorreu apenas nos níveis de umidade relativa próximos ao ponto de saturação.

A influência da temperatura na conidiogênese de *B. bassiana* "in vitro" foi estudada por WALSTAD *et al.* (1970). Estes autores afirmaram que a conidiogênese ocorreu mesmo em temperaturas menores que 10°C e maiores que 35°C, sendo mais rápida a 25 e 30°C. Os resultados do presente trabalho mostraram que a conidiogênese sobre o cadáver do inseto não ocorreu a 30°C, discordando das informações dos autores citados. Esta divergência pode ser explicada pela grande quantidade de microorganismos, interna e externamente, presentes no cadáver do inseto ("in vivo") e ausentes no meio de cultura ("in vitro"). Estes microorganismos, especialmente bactérias e fungos contaminantes, como *Aspergillus*, favorecidos pelas temperaturas mais altas, colonizam o hospedeiro mais rapidamente que *B. bassiana*. Desta forma o fungo entomopatogênico pode infectar e matar o inseto, mas seu desenvolvimento micelial e a conidiogênese são inibidos pela ação mais rápida dos contaminantes.

Os números médios de conídios de *B. bassiana* produzidos sobre o cadáver de *C. arcuata* em diferentes combinações de fatores são apresentados no Quadro 2.

O número médio de conídios produzidos por inseto variou de $3,4 \times 10^7$ a $7,1 \times 10^7$. A umidade relativa e concentração do fungo nos níveis testados, não influenciaram significativamente na produção de conídios. A temperatura afetou a produção de conídios. A média geral de conídios produzidos por inseto a 24°C foi de $6,3 \times 10^7$, diferindo significativamente dos $4,4 \times 10^7$ conídios por inseto produzidos a 17,5°C. Estudo semelhante foi feito por RAMOSKA (1984). Este autor encontrou diferenças na produção de conídios sobre cadáver do percevejo das gramíneas *Blyssus leucopterus*, em função da umidade relativa. O número médio de conídios por inseto foi de $1,2 \times 10^5$ a 75% e $4,4 \times 10^6$ a 100% de umidade relativa. A produção de conídios sobre o inseto a 75% de umidade relativa, obtida por este autor, é contraditória com os resultados obtidos no presente trabalho, e nos trabalhos de outros autores (SCHAERFFENBERG, 1964; FERRON, 1977; RIBA & MARCANDIER, 1984), nos quais a conidiogênese somente ocorreu em umidades relativas próximas a 100%. Provavelmente esta divergência é devida às diferenças relativas aos sistemas de controle de umidade relativa, espécie do inseto e raça do fungo utilizados nos vários trabalhos.

QUADRO 2 - Produção de conídios de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Ceratomya arcuata* mortos e mantidos sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios. EMBRAPA/CNPAF, 1986.

Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Número médio de conídios/inseto x 10 ⁷			Média
		Concentração de inóculo (conídios/ ml x 10 ⁷)			
		1	10	100	
17,5 ± 1	99 ± 1	4,9	5,7	4,2	4,9a*
	89 ± 1	4,5	3,8	3,4	3,9a
24 ± 1					4,4 A
	99 ± 1	6,4	7,1	6,8	6,8a
	89 ± 1	6,0	4,6	6,8	5,8a
					6,3 B
	Média	5,4a	5,3a	5,3a	-

(*) Médias seguidas pela mesma letra na linha ou na coluna não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

A sobrevivência do fungo *B. bassiana* na fase micelial no interior do cadáver, em diferentes condições e durante 60 dias, é mostrada no Quadro 3.

A temperatura e umidade relativa influenciaram na sobrevivência do fungo, mas a concentração aplicada não foi importante. A 30°C nenhum inseto apresentou conidiogênese após 60 dias. Entretanto, a porcentagem média de conidiogênese nesta temperatura não ultrapassou 12,5% na primeira amostragem, mostrando que mesmo em unidades relativas baixas os contaminantes se desenvolveram e inibiram *B. bassiana*.

Nas demais temperaturas e na umidade relativa mais baixa houve um decréscimo acentuado na sobrevivência do fungo da primeira para a última amostragem. A porcentagem média de conidiogênese caiu de 75 para 33,9% a 17,5°C e de 79,2 para 22,6% a 24°C. Enquanto na umidade relativa mais alta a porcentagem média de conidiogênese após 60 dias foi de 72,8% a 17,5°C e 66,8% a 24°C. A morte mais rápida do fungo a 59% de umidade relativa pode ser devida ao dessecação. A umidade interior do inseto morto é muito influenciada pela umidade relativa atmosférica, e em conseqüência, o micélio é dessecação e perde viabilidade mais rapidamente nas menores umidades relativas.

QUADRO 3 - Sobrevivência de *Beauveria bassiana* no interior de adultos de *Ceratomya arcuata* mortos sob diferentes combinações de temperatura, umidade relativa e concentração de conídios, e mantidos nas mesmas condições durante 60 dias. EMBRAPA/CNPAF, 1986.

Temperatura (°C)	Umidade relativa (%)	Concentração de conídios (conídios/ml x 10 ⁷)	Sobrevivência (% de conidiogênese)			
			Dias de amostragem*			
			0	10	30	60
17,5 ± 1	72 ± 4	1	-	87,5	87,5	83,3
		10	100	87,5	75,0	63,6
		100	87,5	100	62,5	71,4
		Média	93,7	91,7	75,0	72,8
	59 ± 5	1	-	75,0	62,5	27,3
		10	62,5	87,5	62,5	30,0
		100	87,5	87,5	75,0	44,4
		Média	75,0	83,3	66,7	33,9
	72 ± 4	1	75,0	62,5	62,5	63,6
		10	87,5	100	100	66,7
		100	100	87,5	100	66,7
		Média	87,5	83,3	87,5	66,8
24 ± 1	59 ± 5	1	50,0	62,5	62,5	9,1
		10	87,5	87,5	50,0	28,6
		100	100	100	62,5	30,0
		Média	79,2	83,3	58,3	22,6
30 ± 1	72 ± 4	1	12,5	0	0	0
		10	0	0	12,5	0
		100	25,0	0	25,0	0
		Média	12,5	0	12,5	0
30 ± 1	59 ± 5	1	0	12,5	0	0
		10	12,5	0	12,5	0
		100	25,0	0	25,0	0
		Média	12,5	4,2	12,5	0

(*) 8 insetos por dia de amostragem tomados ao acaso.

Estes dados mostram que *B. bassiana* pode sobreviver, na fase micelial, dentro dos cadáveres de insetos, em condições de temperatura e umidade relativa desfavoráveis à conidiogênese, por mais de 60 dias. Esta pode ser uma forma importante de sobrevivência de fungos sob condições de campo. Assim, o fungo se mantém dentro do inseto até que ocorram condições favoráveis à conidiogênese. Além disso, é possível que em condições desfavoráveis, ocorram estruturas especiais de resistência que aumentam o tempo de sobrevivência, não só de *B. bassiana*, como de outros fungos. Esta é uma área em que pesquisas e estudos mais aprofundados precisam ser desenvolvidos.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que:

- A conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres *C. arcuata* é limitada por altas temperaturas ou baixas umidades relativas.

- A produção de conídios de *B. bassiana* sobre *C. arcuata* foi maior a 24°C, sendo pouco influenciada pela concentração do inóculo.

- O fungo *B. bassiana* pode sobreviver no interior de cadáveres de *C. arcuata* por várias semanas sob temperaturas e umidades relativas desfavoráveis à conidiogênese.

LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B. Epizootiologia. In: ALVES, S.B. (ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1986, p. 29-60.
- CLERK, T.C. & MADELIN, M.F. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. *Trans. British Mycol. Soc.* 48 (2): 193-209, 1965.
- DAOUST, R. A. & PEREIRA, R.M. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in the laboratory in Brazil. *Environ. Ent.* 15: 642-647, 1986.
- FERRON, P. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (fungi imper-

- fecti, Monialiales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga* 22(4):393-396, 1977.
- RAMOSKA, W.A. Influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity, and replication in the chinch bug *Blissus leucopterus*. *J. Invertebr. Pathol.* 43:389-394, 1984.
- RIBA, G. & MARCANDIER, S. Influence de l'humidité sur l'agressivité et la viabilité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemantet de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, hypomycètes pathogènes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hubn. *Agronomie* 4(2):189-194, 1984.
- ROBERTS, D.W. & YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D. *Microbial control of insects and mites*. New York, Ed. Burgess, Academic Press, 1971. p. 125-149.
- SCHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. *J. Insect Pathol.* 6: 8-20, 1964.
- WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; TAMBAUCH, W.J.S. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invertebr. Pathol.* 16: 221-226, 1970.