

PATOGENICIDADE DO ISOLADO I-149Bb DE *Beauveria bassiana* (BALS.)
VUILL. A ADULTOS DE *Anthonomus grandis*
(COLEOPTERA, CURCULIONIDAE)¹

João L.B. Coutinho²

José V. de Oliveira³

ABSTRACT

Pathogenic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., isolated I-149Bb on adults of *Anthonomus grandis* (Coleoptera, Curculionidae)

The isolated I-149Bb of *Beauveria bassiana* was highly pathogenic for the boll weevil, *Anthonomus grandis* BOHEMAN, 1843 through bioassays in laboratory. Adults were innoculated by immersion in concentrations ranging from $3,72 \times 10^{10}$ to $3,72 \times 10^6$ conidia/ml. Mortality ranged from 100% to 67,5%, up to 37 days after inoculation. Median lethal time (L T₅₀) varied according to the concentrations, ranging from 5,92 to 14,5 days for concentrations $3,72 \times 10^{10}$ and $3,72 \times 10^6$, respectively. The median lethal concentrations (L C₅₀) were $2,59 \times 10^{10}$ and $1,30 \times 10^7$ conidia/ml, 7 days after inoculation, respectively. Conidia production on dead *A. grandis* cadavers varied according to the innoculated concentration. Highest and lowest conidia production were obtained at the concentrations of $3,72 \times 10^{10}$ and $3,72 \times 10^6$, respectively.

RESUMO

O isolado I-149Bb de *Beauveria bassiana*, mostrou-se através de bioensaios em laboratório ser altamente patogênico ao *Anthonomus grandis* Boheman, 1843. Adultos foram inoculados através de imersão em concentrações que variaram de $3,72 \times 10^{10}$ a $3,72 \times 10^6$ conídios/ml do patógeno e as mortalidades observadas situaram

Recebido em 12/02/90

¹ Parte da dissertação apresentada pelo 1º autor na UFRPE, 1987.

² Empresa IPA-Recife/PE.

³ UFRPE-Recife/PE. Bolsita do CNPq.

-se entre 100,0 a 67,5%. A mortalidade provocada pelo patógeno foi observada até os 37 dias após a inoculação. Os tempos letais, variaram em relação as concentrações inoculadas, sendo detectados os limites de 5,92 a 14,5 dias, para as concentrações $3,72 \times 10^{10}$ e $3,72 \times 10^6$, respectivamente. As concentrações letais, apresentaram valores de $2,59 \times 10^{10}$ e $1,30 \times 10^7$ conídios/ml aos 7 e 14 dias após a inoculação, respectivamente. As produções de conídios sobre cadáveres de *A. grandis* variaram de acordo com as concentrações inoculadas, obtendo-se a maior e menor produção para as concentrações $3,72 \times 10^{10}$ e $3,72 \times 10^7$, respectivamente.

INTRODUÇÃO

Estudos com entomopatógenos vêm sendo intensificados visando o controle de pragas, destacando-se, o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., o qual provoca enfermidades em mais de uma centena de espécies de insetos (STEINHAUS, 1969; ALESHINA, 1978).

Com a detecção de *Anthonomus grandis* Boheman, 1843, bicudo do algodoeiro no Brasil em 1983, pesquisas vêm sendo realizadas objetivando o controle da praga com *B. bassiana*.

McIAUGLIN (1966) verificou em laboratório, que *B. bassiana* foi pagênico para *A. grandis* nos estágios de larva, pupa e adulto e os níveis de mortalidade observados foram de 100,0 e 69,0% para adultos e de 26,0% para larvas, 5 dias após a inoculação.

Utilizando uma cepa de *B. bassiana* proveniente de Campinas -SP, CAMARGO *et al.* (1984) inocularam adultos do bicudo através das vias seca e úmida, observando mortalidades que variaram de 53,1 à 71,8%, para um período de 55 dias após a inoculação.

COUTINHO & CAVALCANTI (1988) utilizaram armadilhas de feromônio (Hardee) contendo na câmara de captura cultura de *B. bassiana* para contaminar bicudos a nível de campo. Os resultados revelaram uma mortalidade de 87,3% para um período de 15 dias após a contaminação. Em laboratório, a mortalidade foi de 100,00% para um período que variou de 4 a 11 dias após a inoculação.

GUTIERREZ (1986) inoculou o isolado 292 de *B. bassiana* em concentrações que variaram de 10^{10} a 10^4 conídios/ml em adultos do bicudo, obtendo mortalidades que variaram de 2,0 a 96,6% para um período de 16 a 18 dias após a inoculação.

Face ao grande potencial que apresenta o fungo *B. bassiana* para o controle de pragas, desenvolveu-se esta pesquisa visando determinar através de bioensaios, parâmetros biológicos do isolado I-149Bb do patógeno, em relação a adultos de *A. grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram desenvolvidos no laboratório de Controle Biológico da Empresa IPA, sob condições de temperatura média de 27,2°C com limites de 29,9 e 24,2°C, umidade relativa de 77% com limites de 80 e 71% e fotoperíodo de 12 horas.

O isolado I-149Bb de *B. bassiana* foi selecionado através de bioensaios e cultivado em uma garrafa de Roux contendo arroz autoclavado. Após um período de incubação de 10 dias à temperatura de 25°C, em regime de luz constante procedeu-se o preparo das suspensões de conídios. A garrafa de Roux recebeu 200ml de água esterilizada mais espalhante adesivo na concentração de 0,01%, e após agitação automática, durante 5 minutos a suspensão foi filtrada e quantificada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Os adultos de *A. grandis* foram coletados manualmente em campo e, em seguida, conduzidos para laboratório onde permaneceram em gaiolas teladas e alimentados com botões florais de algodão. As gaiolas utilizadas no experimento eram de acrílico transparente, de formato cônico, com as seguintes dimensões: a base inferior com um diâmetro de 75mm, a base superior com 50mm de diâmetro e contendo nesta, uma seção telada de 25mm de diâmetro a fim de permitir as trocas gasosas. Tanto os insetos como os botões florais sofreram um processo rápido de desinfecção com hipocloreto de sódio à 1,25% e em seguida, passaram por 3 lavagens em água esterilizada.

Para a determinação da concentração de conídios mais efetiva em relação a praga, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos constaram das seguintes concentrações: $3,72 \times 10^{10}$, $3,72 \times 10^9$, $3,72 \times 10^8$, $3,72 \times 10^7$ e $3,72 \times 10^6$ conídios/ml e mais a testemunha, onde se utilizou apenas água esterilizada. A parcela constou de uma gaiola de acrílico, contendo 10 insetos adultos não sexados e 5 botões florais. A inoculação foi realizada através de uma rápida imersão dos insetos nas concentrações fúngicas estudadas. Os botões florais foram trocados a cada 48 horas.

As observações de mortalidade foram realizadas diariamente e os insetos mortos, eram desinfetados e colocados em uma câmara úmida para constatação do parasitismo.

As análises estatísticas foram realizadas aos 14 e 120 dias, após a morte de todos os insetos inoculados. Para determinação dos tempos letais (TL₅₀) e concentrações letais (CL₅₀), utilizaram-se as observações de mortalidades do experimento anterior, sendo que, para as CL₅₀ as análises foram realizadas nos períodos de 7 e 14 dias após a inoculação, utilizando-se um programa de próbite segundo DAUN (1970).

Para a determinação da produção de conídios sobre cadáveres dos insetos, foram utilizados os insetos parasitados pelo

patógeno dentro das concentrações estudadas, 7 dias após sua morte. Os conídios foram retirados através da introdução de 5 insetos em tubos de ensaio contendo 5ml de água destilada mais espalhante adesivo, na concentração anterior. Após intensa agitação automática, durante 10 minutos, foram quantificados os conídios através de uma câmara de Neubauer. A concentração obtida, multiplicada pelo volume de água e dividido pelo número de insetos por repetição, forneceu o número de conídios por espécime. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos ($3,72 \times 10^{10}$ a $3,72 \times 10^6$ conídios/ml) e 4 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mortalidades obtidas foram crescentes em função do aumento das concentrações de conídios aos 14 dias após a inoculação (Quadro 1). Pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, a concentração de $3,72 \times 10^8$ atingiu uma posição intermediária, não diferindo das maiores e menores concentrações (Quadro 1).

Aos 120 dias, os percentuais de mortalidade apresentaram a seguinte ordem decrescente: $3,72 \times 10^{10}$ (100,0%) $3,72 \times 10^8$ (92,5) $3,72 \times 10^9$ (82,5%) $3,72 \times 10^6$ (70,0%) $3,72 \times 10^7$ (67,5%) atingidos aos 17,36, 18, 29 e 37 dias, respectivamente, após a inoculação. Pelo mesmo teste, a concentração $3,72 \times 10^{10}$ atingiu o percentual máximo de mortalidade diferindo apenas da concentração $3,72 \times 10^7$. As demais concentrações $3,72 \times 10^9$ a $3,72 \times 10^6$, não diferiram entre si (Quadro 2). As percentagens finais de mortalidade estão representadas graficamente na Figura 1.

Todas as concentrações do isolado I-149Bb provocaram maiores percentuais de mortalidade do bicudo em relação às obtidas por GUTIERREZ (1986), para o isolado 292 do patógeno, nas mesmas concentrações estudadas.

Os resultados obtidos para os tempos letais (TL₅₀) estão apresentados no Quadro 3, com os limites de confiança ao nível de 5% de probabilidade. Com o aumento da concentração de conídios inoculados, observou-se uma redução dos TL₅₀. A menor concentração de conídios, $3,72 \times 10^6$, foi a que apresentou o maior TL₅₀ de 14,5 dias e a maior, $3,72 \times 10^{10}$, o menor TL₅₀ de 5,92 dias. As concentrações intermediárias $3,72 \times 10^9$, $3,72 \times 10^8$ e $3,72 \times 10^7$ apresentaram, respectivamente, os TL₅₀ de 8,94, 10,47 e 13,80 dias. Os TL₅₀, observados neste trabalho são inferiores aos obtidos por ALVES *et al.* (1986) e GUTIERREZ (1986) para bicudos com 8 dias após iniciada a oviposição. GUTIERREZ (1986) relata TL₅₀ inferiores para as concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 , quando inoculou bicudos com 2 a 3 dias de idade e para insetos coletados em campo e para as concentrações 10^8 e 10^6 os TL₅₀ foram superiores aos obtidos neste trabalho, excetuando-se, para os insetos coletados do campo, para a concentração 10^7 conídios/ml.

Estas diferenças entre os TL₅₀ dos trabalhos citados, possivelmente sejam devido à virulência do isolado de *B. bassiana*, quantidade de conídios inoculada, aliados às condições de temperatura, umidade e fotoperíodo em que os trabalhos foram realizados.

No Quadro 4 são apresentados os valores das concentrações letais CL₅₀ para 7 e 14 dias, com os respectivos limites de confiança ao nível de 5% de probabilidade. As CL₅₀ observadas aos 7 e 14 dias foram de $2,59 \times 10^{10}$ e $1,30 \times 10^7$ conídios/ml, respectivamente. ALVES *et al.* (1986) observaram para 12 e 14 dias as DL₅₀ de $1,90 \times 10^{11}$ e $5,00 \times 10^{10}$ conídios/ml, respectivamente. Neste trabalho, observou-se uma CL₅₀ para 14 dias de $1,30 \times 10^7$ conídios/ml, com potenciais menores em aproximadamente 10^4 e 10^3 conídios/ml, em relação ao trabalho de ALVES *et al.* (1986). GUITERREZ (1986), observou DL₅₀ de $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $2,29 \times 10^7$ conídios/ml, para bicudos com 2 e 3 dias de idade, 8 dias após iniciada a oviposição e coletados em campo, respectivamente.

De acordo com o Quadro 5, observa-se uma correlação entre a concentração e a produção de conídios sobre cadáveres do bicudo.

Os números máximos e mínimos de conídios produzidos sobre cadáveres de bicudos variaram de $2,26 \times 10^7$ a $6,59 \times 10^6$ conídios, para as concentrações de $3,72 \times 10^{10}$ e $3,72 \times 10^7$, respectivamente. A concentração $3,72 \times 10^{10}$ diferiu pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, das concentrações $3,72 \times 10^6$ e $3,72 \times 10^7$, entretanto, não diferiu das concentrações $3,72 \times 10^9$ e $3,72 \times 10^8$.

CONCLUSÕES

- A concentração de $3,72 \times 10^{10}$ conídios/ml de *B. bassiana*, foi a que provocou maior mortalidade de *A. grandis* embora não tenha diferido estatisticamente das concentrações $3,72 \times 10^9$ e $3,72 \times 10^8$.

- Os TL₅₀ variaram em função das concentrações de conídios inoculados, sendo detectados os limites de 5,92 e 14,50 dias para as concentrações de $3,72 \times 10^{10}$ e $3,72 \times 10^6$ respectivamente.

- As CL₅₀ obtidas apresentaram os valores de $2,59 \times 10^{10}$ e $1,30 \times 10^7$ conídios/ml aos 7 e 14 dias após a inoculação, respectivamente.

- Houve uma maior produção de conídios sobre os cadáveres de *A. grandis*, com o aumento da concentração.

QUADRO 1 - Percentagens de mortalidade de adultos de *Anthonomus grandis* em relação a concentrações de conídios do isoaldo I-149Bb de *Beauveria bassiana*, 14 dias após inoculação. Dados transformados em $\sqrt{x} + 1$.

CONCENTRAÇÃO (Conídios/ml)	MORTALIDADES	
	PERCENTAGENS	MÉDIAS ¹ TRANSFORMADAS
$3,72 \times 10^{10}$	97,5	3,28a
$3,72 \times 10^9$	80,0	2,99ab
$3,72 \times 10^8$	70,0	2,81ab
$3,72 \times 10^7$	52,5	2,48 b
$3,72 \times 10^6$	47,5	2,37 b
Testemunha	10,0 ²	1,38 c

CV = 12,35%

D.M.S. = 0,70

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

² Mortalidade natural.

QUADRO 2 - Percentagens finais de mortalidade de adultos de *Anthonomus grandis* em relação a concentrações de conídios do isolado I-149Bb de *Beauveria bassiana*, 120 dias após a inoculação. Dados transformados em $\sqrt{x} + 1$.

CONCENTRAÇÃO (Conídios/ml)	MORTALIDADE FINAL DO EXPERIMENTO		
	PERCENTAGENS	MÉDIAS ¹ TRANSFORMADAS	DIA ²
$3,72 \times 10^{10}$	100,0	3,31a	17
$3,72 \times 10^8$	92,5	3,20ab	36
$3,72 \times 10^9$	82,5	3,03ab	18
$3,72 \times 10^6$	70,0	2,83ab	29
$3,72 \times 10^7$	67,5	2,77 b	37
Testemunha	100,0 ³	-	120

C.V. = 7,34%

D.M.S. = 0,48

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

² Dias após a inoculação nos quais foi atingida a mortalidade.

³ Mortalidade natural.

QUADRO 3 - Tempos letais (TL₅₀), para adultos de *Anthonomus grandis* em relação a concentrações de conídios do isolado I-149Bb de *Beauveria bassiana*.

CONCENTRAÇÃO (Conídios/ml)	TL ₅₀ (dias)	LIMITES DE CONFIANÇA (dias) ¹		
3,72 x 10 ¹⁰	5,92	5,51	-	6,31
3,72 x 10 ⁹	8,94	8,32	-	9,54
3,72 x 10 ⁸	10,47	9,81	-	11,16
3,72 x 10 ⁷	13,80	12,80	-	15,01
3,72 x 10 ⁶	14,50	13,49	-	15,78
Testemunha	36,20	27,19	-	67,06

¹ Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 4 - Concentrações letais (CL₅₀) do isolado I-149Bb de *Beauveria bassiana*, em relação a adultos de *Anthonomus grandis*.

DIAS	CL ₅₀ (Conídios/ml)	LIMITES DE CONFIANÇA (Conídios/ml) ¹	
7	2,59 x 10 ¹⁰	3,96 x 10 ¹¹	- 6,24 x 10 ⁹
14	1,30 x 10 ⁷	4,72 x 10 ⁷	- 1,88 x 10 ⁶

¹ Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 5 - Produção de conídios de isolado I-149Bb sobre cadáveres de adultos de *Anthonomus grandis* em relação a concentrações de *Beauveria bassiana*. Dados transformados em \sqrt{x} .

CONCENTRAÇÕES (Conídios/ml)	MÉDIAS ORIGINAIS (n x 10 ⁶)	MÉDIAS TRANSFORMADAS
3,72 x 10 ¹⁰	2,25a	4,61
3,72 x 10 ⁹	15,70ab	3,93
3,72 x 10 ⁸	12,56abc	3,50
3,72 x 10 ⁶	10,02 bc	3,09
3,72 x 10 ⁷	7,70 c	2,77

C.V. = 15,36%

D.M.S. = 1,07

¹ Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

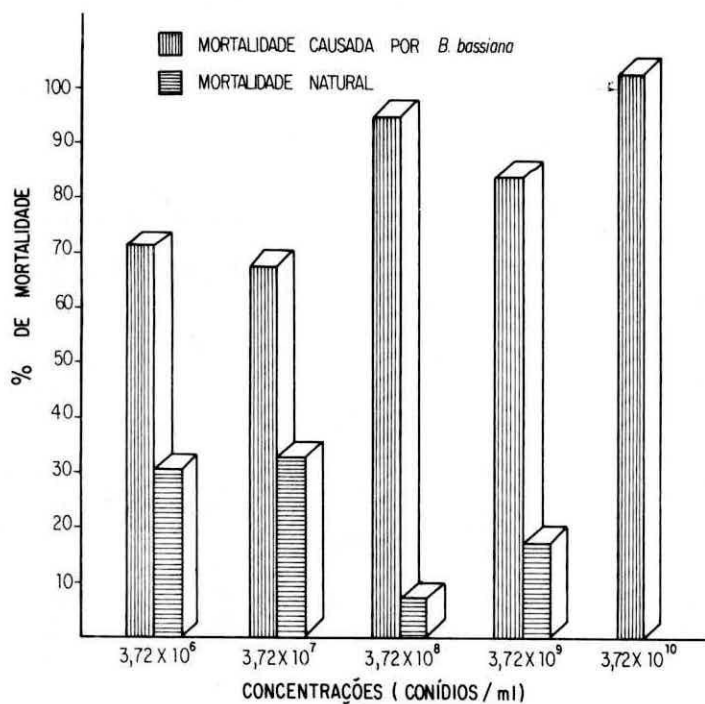


FIGURA 1 - Percentagens finais de mortalidade de *A. grandis* em relação a cinco concentrações do isolado I-149Bb de *B. bassiana*.

LITERATURA CITADA

- ALESHINA, O.A. Composition and prospects for study the entomopathogenic fung of the URSS. *Micologia i Fitopatologiya* Moscou, 12(6):457-460, 1978.
- ALVES, S.B.; JARAMILLO, C.B.J.; SILVEIRA NETO, S. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., isolado 61 ao bicudo do algodoeiro. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10, Rio de Janeiro, 1986. p. 186. *Resumos*
- CAMARGO, L.M.P.C. de; BATISTA FILHO, A.; BASTOS CRUZ, B.P. Ocorrência do fungo *Beauveria bassiana* sp. patogênico ao "bicudo" do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) na Região de Campinas, Estado de São Paulo. *O Biológico* 50 (3):65-68, 1984.
- COUTINHO, J.L.B. & CAVALCANTI, V.A.L.B. Utilização do fungo *Beauveria bassiana* no controle biológico do bicudo do algodoeiro em Pernambuco. *Pesqui. Agropec. bras.* 23(5):455-461, 1988.
- DAUN, R.J. A revision of tow computer programs for probit analyses. *Bull. ent. Soc. Am.* 16(1):105-106, 1970.
- GUTIERREZ, G.S. *Bicologia de Anthonomus grandis Boheman, 1843 (Col.: Curculionidae) e seu controle com Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Piracicaba, ESALQ/USP, 1986. 106p. (Tese Mestrado).*
- McLAUGHLIN, R.E. Infectivity test with *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillimin on *Anthonomus grandis* Boheman. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 386-388, 1966.
- STEINHAUS, E.A. Enfermidades microbianas de los insetos. In: De BACH, P. *Control biologico de las plagas de insectos y malas hierbas.* México, Continental, 1969, p. 607-645.