

PERSISTÊNCIA DE *Beauveria bassiana* EM SOLO DE CERRADO E SUA
INTERAÇÃO COM MICROORGANISMOS DO SOLO¹

Eliane D. Quintela², Jeffrey C. Lord³, Sérgio B. Alves⁴ e
Donald W. Roberts⁵

ABSTRACT

Persistence of *Beauveria bassiana* in cerrado soil and its
interaction with soil microbes

Survival of *Beauveria bassiana* conidia in an oxisol soil was evaluated under laboratory and field conditions. In the laboratory, survival decreased with increasing temperature of 17, 24 and 30°C and was greater in soil with 25% than in soil of 75% water saturation. An increase in the number of colony forming units (CFU) was observed through the first 24-52 days in the unautoclaved soil with 25% water saturation held at 17 or 24°C. In autoclaved soil was observed the same behavior in the first 24 days, in these temperatures. At 17 or 24°C and 25% water saturation, the number of CFU was lower in autoclaved than in unautoclaved soil beginning 38 days after inoculation. The number of non-*Beauveria* fungi and actinomycetes colonies was greater in autoclaved than in unautoclaved soil. Autoclaved soil

Recebido em 24/9/90

- 1 Parte da tese apresentada pelo primeiro autor para obtenção do título de mestre em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, SP.
- 2 EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Caixa Postal 179, 74001 Goiânia GO.
- 3 Insects Affecting Man and Animals Laboratory, P.O. Box 14565 Gainesville, Florida 32604 USA.
- 4 Departamento de Entomologia, Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba SP.
- 5 Insect Pathology Resource Center, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Tower Rd., Ithaca, New York 14853 USA.

inoculated with *B. bassiana* produced fewer colonies of nonfilamentous bacteria and actinomycetes than uninoculated soil, indicating an inhibition of these organisms by *Beauveria*. In the field, soil beneath a cowpea crop canopy was more conducive to conidia survival than exposed soil. Conidia mixed into the top three cm of bare soil survived no longer than conidia applied to the surface of exposed soil.

RESUMO

A sobrevivência de conídios de *Beauveria bassiana* em solo, terra roxa estruturada latossolica eutrófica, foi avaliada em condições de laboratório e campo. No laboratório, a sobrevivência diminuiu com o aumento na temperatura de 17, 24 e 30°C e foi maior no solo com 25% do que em solo com 75% da saturação de água. Foi observado um aumento nas unidades formadoras de colônias (UFC) durante os 52 dias em solo não autoclavado, com 25% da saturação, mantido a 17 ou 24°C. Em solo autoclavado observou-se comportamento similar nos 24 primeiros dias, nestas temperaturas. Após 38 dias da inoculação, iniciou-se um declínio mais acentuado no número de UFC em solo autoclavado em relação ao não autoclavado, em temperaturas de 17 ou 24°C. O número de outros fungos que não *Beauveria* e colônias de actinomicetos foi maior em solo autoclavado do que em não autoclavado. Solo autoclavado inoculado com *B. bassiana* produziu menos colônias de bactérias e actinomicetos, quando comparado a solo não inoculado, indicando inibição destes organismos por *Beauveria*. No campo, solo com planta de caupi constituiu ambiente mais favorável à manutenção de conídios de *B. bassiana*, quando comparado ao solo desnudo. Em solos desnudos, conídios misturados aos 3 cm superficiais, não tiveram maior sobrevivência do que conídios aplicados na superfície.

INTRODUÇÃO

O ambiente solo normalmente oferece condições favoráveis de temperatura e umidade para o desenvolvimento de doenças fúngicas em insetos (ALVES, 1986; ROBERTS & CAMPBELL, 1977; ROBERTS & WRIGHT, 1986). Desta forma, a ocorrência de fungos no solo pode ser um importante fator de mortalidade natural de insetos (AESCHLIMANN *et al.*, 1985; KELLER, 1983). Tentativas de explorar o solo como um meio para controle de insetos com patógenos tem sido concentradas nos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Beauveria* spp. Tratamento do solo com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, e *B. brongniartii* (Sacc.) Petch tem sido capaz de reduzir populações do besouro da batata, *Lep tinotarsa decemlineata* Say (WATT & LEBRUM, 1984), e o curculioní-

do *Sitona lineatus* (L.) (MULLER KOGLER & STEIN, 1970). *B. bassiana* foi altamente infeccioso a larvas do manhoso *Chalcodermus bimaculatus* Boheman, em pulverizações no solo (QUINTELA, 1986).

Para um controle eficiente de insetos no solo há necessidade de se conhecer o comportamento do fungo neste ambiente, estudando-se não somente a sobrevivência do inóculo como também sua interação com outros microorganismos. No caso de *B. bassiana*, LINGG & DONALDSON (1981) demonstraram inibição na sobrevivência do inóculo no solo devido a temperatura, umidade e microorganismos.

O trabalho objetivou determinar o efeito de temperatura, conteúdo de água e microorganismos sobre *B. bassiana* em solo do cerrado em condições de laboratório e avaliar sua persistência a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e produção do fungo

A cepa de *B. bassiana* utilizada foi isolada de *Cerotoma* sp. (Coleoptera - Chrysomelidae), na Costa do Surubim, Estado do Amazonas, denominada CP₅ na micoteca do laboratório de Patologia de Insetos do CNPAF.

Os conídios foram produzidos em meio de batata, dextrose, extrato de levedura e agar. As placas foram mantidas a 27°C e, após 14 dias, os conídios foram coletados, passados através de peneiras de malha de 425 µm e 250 µm e armazenados a 4°C em sílica gel.

Solo

O solo utilizado nos experimentos de laboratório e campo foi terra roxa estruturada latossólica eutrófica, da região do cerrado da fazenda experimental do CNPAF, Goianira, Go. Nos testes de laboratório o solo foi coletado a 5 cm de profundidade, seco ao ar em casa de vegetação, por uma semana, e peneirado em malha de 2 mm. O solo foi autoclavado em lotes de 700 g a 121°C, por 2 horas.

A análise do solo indicou a seguinte composição: Argila 54%, Areia 33%, Silte 13%, matéria orgânica 0,9%, Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ 1,8 me/100 ml, Al⁺⁺⁺ 0,3 me/100 ml, P 3,3 ppm, K⁺ 62 me/100 ml, Zn 2,3 ppm, Fe 192 ppm, Mn 40 ppm, pH em água (1 g: 2,5 ml) 5,4.

O ponto de saturação de água foi aproximadamente 50 ml/100g de solo determinado através do método de "terra fina seca ao ar" (T.F.S.A.) descrito pelo manual de métodos de análise de solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1979).

Meio Seletivo

O meio seletivo de PEREIRA *et al.* (1979) foi usado para as primeiras avaliações de *B. bassiana* no solo. Devido a necessidade de suspensões mais concentradas nas últimas avaliações que continham maior número de contaminantes foi utilizado o meio de Heck (LINGG & DONALDSON, 1981) modificado: 65 g Saboraud dextrose agar, 10 g oxgall, 80 mg oxytetraciclina, 250 mg Cyclohexamida, 50 mg KMNO₄, 400.000 UI/ml de penicilina G, e 50 mg de sulfato de estreptomicina.

Experimentos em condições controladas

Ensaio de persistência de conídios de *B. bassiana* foi conduzido em três repetições em um esquema fatorial, inteiramente casualizado, de três temperaturas: 17, 24 e 30°C; com dois níveis de umidade no solo (25 e 75% da saturação) com sem autoclavagem em laboratório. A parcela, representada por 700g de solo foi inoculada com 0,21 g de conídios de *B. bassiana*, representando aproximadamente 3×10^7 conídios/g de solo, em recipientes de plástico tampados (14 cm de comprimento x 8 cm de largura x 12,5 cm de altura), que permitiam a passagem de ar mas com pouca perda de água. Os recipientes, contendo solo e conídios, foram agitados manualmente para garantir homogeneidade na mistura. Através de amostragens de solo não foi detectada ocorrência natural de *B. bassiana*.

Os recipientes que perdiam peso eram completados semanalmente com água destilada para seu peso inicial. Estes recipientes foram incubados em estufas B.O.D. ("Biological oxygen Demand") em condições não assépticas e a temperatura média dentro da estufa foi medida através de um higrótermógrafo eletrônico, para verificar se a temperatura mantinha-se constante.

As determinações de *B. bassiana* no solo foram realizadas aos 0,8, 24, 38, 52, 80 e 129 dias após a inoculação do fungo. Uma amostra de solo de 11,1 g para os tratamentos com 25% da saturação e 13,6 g para os com 75% foram retiradas das repetições dos tratamentos, com uma espátula, para fazer-se diluições decimais em 90 ml de água destilada. A suspensão era agitada e plaqueou-se 0,1 ml das diluições de 10^4 , 10^5 e 10^6 em meio seletivo na primeira avaliação, em 3 repetições por diluição. Para as avaliações seguintes foram plaqueadas duas diluições em níveis capazes de expressar a presença de conídios no solo. As placas foram incubadas por 7 a 9 dias a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, quando se procedia a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), obtendo-se UFC/g de solo seco.

As avaliações de bactérias, actinomicetos e outros fungos que não *Beauveria* no solo foram realizadas para a temperatura de 24°C e solo com 25% da saturação de água autoclavado e não autoclavado contendo *B. bassiana*. As testemunhas (sem inóculo do fungo) foram mantidas nas mesmas condições, em duas repetições, cada repetição com 700 g de solo. As avaliações de fungos bacterias e actinomicetos presentes no solo foram efetuadas aos 0, 8, 24, 38, 52, 80 e 129 dias após a implantação do experi-

mento, adotando-se a metodologia desenvolvida por Dazzo (s.d.).

Experimento a nível de campo

A estabilidade de *B. bassiana* à nível de campo foi avaliada em um experimento em quatro tratamentos: a) conídios pulverizados na superfície do solo com plantas de caupi com 15 semanas de idade (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. variedade CNCx 252-1E) no espaçamento de 75 x 20cm contendo 6 a 7 sementes/metro linear; b) conídios pulverizados na superfície do solo desnudo (solo descoberto exposto ao sol e chuva); c) conídios misturados nos 3cm superficiais do solo desnudo; d) testemunha sem aplicação do fungo. Os tratamentos foram dispostos aleatoriamente em parcelas de 0,75 x 0,5m em 6 blocos ao acaso. Em cada parcela aplicou-se 0,35g de conídios de *Beauveria* em 80ml de água destilada com Tween 0,1%.

As avaliações foram efetuadas aos 0, 9, 17, 24, 38, 45, 52, 59, 73, 80 e 94 dias após aplicação do fungo. As amostras de solo foram retiradas ao acaso dentro da parcela, nos 3cm superficiais do solo no tratamento c e na superfície nos tratamentos a e b e testemunha. No laboratório foram pesadas 10g de solo de cada repetição dos tratamentos, fazendo-se em seguida diluições decimais e plaqueando-se em meio seletivo de Heck modificado (LINGG & DONALDSON, 1981), como descrito para os experimentos em condições controladas. Foi também efetuada uma avaliação de microrganismos em solo com e sem plantas, em 3 repetições.

Para as análises estatísticas dos resultados, utilizaram-se a análise de variância e teste Tukey a 5% para cada avaliação. A persistência do fungo em condições controladas e a campo foi também avaliada graficamente, através de curvas de sobrevivência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos em condições controladas

- Efeito da temperatura, saturação de água e autoclavagem do solo

A persistência de conídios de *B. bassiana* no solo, nos testes de laboratório, foi grandemente afetada pela temperatura e nível de saturação de água no solo, mas independente da autoclavagem. No solo com 25% de saturação de água, haviam mais UFC no solo mantido a 17 ou 24°C do que em solo mantido a 30°C (Fig. 1). Nessas temperaturas mais baixas houve geralmente, um aumento no número de UFC na terceira data de amostragem (24 dias) (Fig. 1A-NA 25%). Entretanto, em solo não autoclavado mantido a 17°C houve aumento nas UFC nos 52 dias. Neste tratamento, o número médio de UFC/g de solo alcançou $2,1 \times 10^6$ e foi significativamente diferente de $1,5 \times 10^6$ (dms=49,5) obtido em solo

autoclavado na mesma temperatura aos 52 dias (Fig. 1. NA e A25%). O declínio no número de UFC, foi substancialmente menor em solo não autoclavado mantido a 24°C que em solo autoclavado na mesma temperatura. No solo mantido a 30°C, o número de UFC diminuiu em relação as épocas de amostragens (Fig. 1A-NA 25%).

As razões para o aparente aumento na quantidade de *B. Bassiana* recuperado do solo em relação ao início do experimento não são conhecidas. Provavelmente o aumento é resultado do crescimento saprofítico e esporulação de *Beauveria* em pequenas partículas de plantas, embora isto não tenha sido diretamente observado (Fig. 1). Alguns estudos relatam a possibilidade de desen-desenvolvimento de deuteromicetos em pedaços de planta e no solo (OLIVEIRA, 1979; LINGG & DONALDSON, 1981; FARGUES & ROBERT, 1985; ALVES, 1986). Vários autores tem mencionado germinação e crescimento de *B. bassiana* em solo esterilizado, e inibição em solo ou extrato de solo não autoclavado. LINGG & DONALDSON (1981) reportaram crescimento e esporulação de *B. bassiana* em solo esterilizado suplementado com nutrientes, mas nenhum crescimento em solo similarmente complementado e não esterilizado. Semelhantemente, HUBER (1958) descobriu que *B. bassiana* germinou em solo de jardim autoclavado, mas não em solo não esterilizado, e CLERK (1969) relatou que a esterilização de extratos do solo reduziu inibição na germinação. A microflora do solo testado talvez seja mais favorável a germinação e crescimento saprofítico de *B. bassiana* que a microflora de solos e clima temperado usado pelos autores mencionados. Existe também a possibilidade de que o ambiente no solo tenha favorecido a fragmentação de agregados de conídios ou aumentando a sua germinação, resultando em elevada contagem nas UFC.

No tratamento com 75% da saturação de água, não houve aumento no número de UFC de *Beauveria* em relação a contagem inicial, durante o período de incubação (Fig. 1). A persistência dos propágulos nestes tratamentos também foi maior a 17°C e menor a 30°C. Ao contrário dos resultados obtidos em solo a 25% de saturação, a sobrevivência de *Beauveria* a 17°C foi estatisticamente superior em solo autoclavado do que em solo não autoclavado. Este resultado sugere que conteúdo maior de água foi mais favorável a certos microorganismos competidores ou inibidores. A tendência do aumento de *Beauveria* nas temperaturas e conteúdo de água mais baixos está de acordo com os resultados obtidos por LINGG E DONALDSON (1981).

Interação com outros microrganismos do solo

Ao avaliar a presença de microorganismo no solo, alguns fatos são evidenciados nos resultados de contagem de colônias de fungos, bactérias, actinomicetos, com possível influência na sobrevivência de *B. bassiana*. O número de UFC de *Beauveria* em solo não autoclavado a 25% de saturação foi significativamente mais alto que em solo autoclavado após 52 dias (Fig. 1 NA-A 25%). Provavelmente tenha ocorrido liberação de substâncias inibidoras de *Beauveria* devido ao aumento de outros microorga-

nismos que não *Beauveria*. No tratamento com 25% de saturação e 24°C, houve um aumento no número de UFC de outros fungos que não *Beauveria* e actinomicetos na avaliação do 52º dia em solo autoclavado, com *B. bassiana* (Fig. 2 AB). Em solo não autoclavado com *B. bassiana*, o número de colônias de bactérias e actinomicetos diminuiu durante este período, enquanto a quantidade de outros fungos que não *Beauveria* permaneceu essencialmente estável (Fig. 2NAB).

O menor número de colônias de bactérias e actinomicetos em solo autoclavado com *B. bassiana* sugere inibição por substâncias antibióticas produzidas por este fungo (Fig. 2-A e AB). Isto também indica que de fato *Beauveria* multiplicou-se durante as primeiras semanas do experimento. Existe também evidência de inibição de bactérias por *Beauveria* em solo não autoclavado a partir do 38º dia. (Fig. 2-NAB)

De forma geral, solo autoclavado manteve muito maior número de microrganismos que solo não autoclavado, provavelmente devido à falta de competição neste solo, pois na autoclavagem foram eliminados todos os microrganismos e aqueles que contaminaram o solo posteriormente, não tiveram competidores, e puderam desenvolver-se livremente.

Outros fungos que não *Beauveria* permaneceram praticamente constante em ambos os solos (Fig. 2). Em solo autoclavado, o número de UFC permaneceu levemente alto e estável na ausência de *B. bassiana* e aumentou em cada avaliação até os 52 dias na presença de *B. bassiana* (Fig. 2A e AB). Como para bactéria e actinomicetos, isto sugere inibição na multiplicação devido a *B. bassiana*.

Experimento de campo

Aplicação de conídios de *B. bassiana* na superfície do solo com cobertura de plantas de caupi resultou em uma maior persistência do fungo do que aplicação na superfície do solo o misturado nos primeiros 3 cm do solo (Fig. 3). A concentração inicial mais baixa de *B. bassiana* no último tratamento é um reflexo do método de amostragem. Para amostrar a área em que foi aplicado o fungo para este tratamento, amostras foram tomadas a uma profundidade maior e em uma menor área superficial. Isto fez com que a amostra fosse mais diluída neste tratamento em relação aos outros dois testados. Inicialmente, o declínio foi mais rápido nas aplicações na superfície do que a mistura do fungo no solo. A ocorrência de uma chuva pesada durante o intervalo entre a aplicação do fungo e a primeira amostragem, aos 9 dias, provavelmente causou a remoção dos conídios da superfície do solo e também o movimento destes para camadas inferiores do solo (Fig. 4). Na avaliação aos 38 dias, o número médio de UFC nos dois tratamentos sem plantas de caupi caiu a valores significativamente abaixo do tratamento com plantas de caupi ($P < 0,05$) ($dms = 6,9$). Esta diferença estatística foi mantida até a última avaliação aos 94 dias. O tipo de aplicação de *B. bassiana*, na superfície ou misturado ao solo não foi significativo nas 11 avaliações, indicando que o modo de aplicação não interferiu na sobrevivência do fungo no solo.

A diferença na persistência do fungo com cobertura de plantas com relação ao solo desnudo pode ser atribuído em parte a proteção da radiação solar e chuva proporcionado pela folhagem. A mistura do inóculo nos três cm no solo também proporcionou alguma proteção destes fatores, mas altas temperaturas foram obtidas nas camadas mais superficiais do solo desnudo. Na estação agrometeorológica perto do campo experimental, temperaturas acima de 35°C foram registradas várias vezes, em solo descoberto durante o desenvolvimento do experimento, enquanto temperaturas em solo coberto com grama não excedeu 28°C (Fig. 4). Em adição, a umidade é muito mais alta no solo abaixo da superfície do que na superfície, onde a perda de água ocorre mais rapidamente. Como indicado pelos resultados dos testes de laboratório e os de LINGG & DONALDSON (1981), esta umidade mais alta pode ter tido um efeito negativo na sobrevivência do propágulo. A avaliação do número de microrganismos em solo com e sem plantas de caupi não foi significativa para bactérias, fungos e actinomicetos.

Um mês após aplicação de *B. bassiana* no solo, grande número de UFC estavam ainda presentes em todos os tratamentos. Seria importante investigar o impacto desse resíduo sobre a praga e um intervalo apropriado para reaplicação.

CONCLUSÕES

- A sobrevivência de conídios de *Beauveria bassiana* no solo diminui quanto mais elevada a temperatura e percentagem de saturação de água no solo.
- *Beauveria bassiana* inibe o crescimento de bactérias e actinomicetos no solo.
- Solos com plantas de caupi propiciam maior proteção à *B. bassiana* que solos desnudos.
- Conídios de *B. bassiana* misturados na camada superficial até os três cm de solo desnudo não sobrevivem mais tempo que conídios aplicados na superfície do solo exposto.

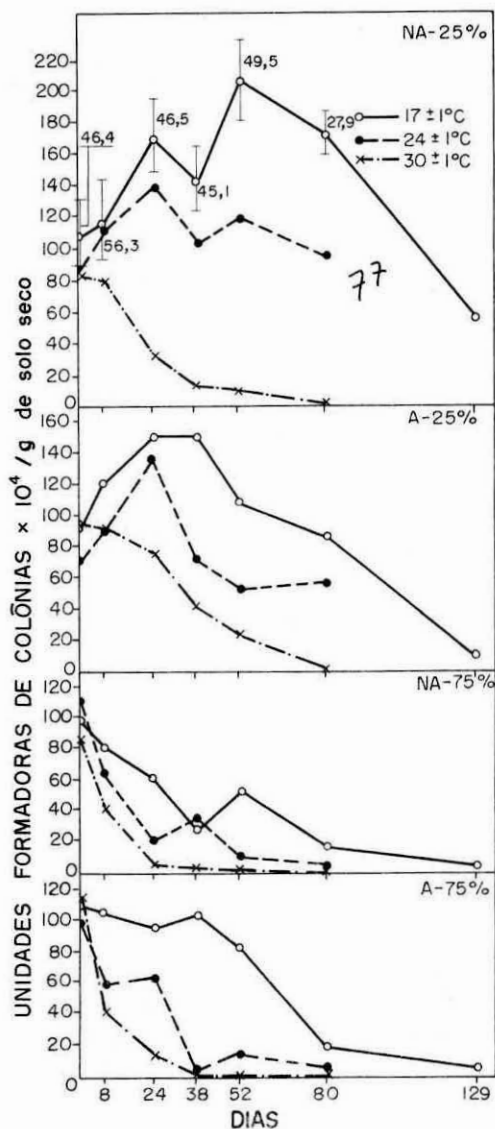


FIGURA 1 - Unidades formadoras de colônias $\times 10^4$ de *Beauveria bassiana* em solo autoclavado (A) e não autoclavado (NA) em diferentes temperaturas e saturações de água no solo de 25 e 75%. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

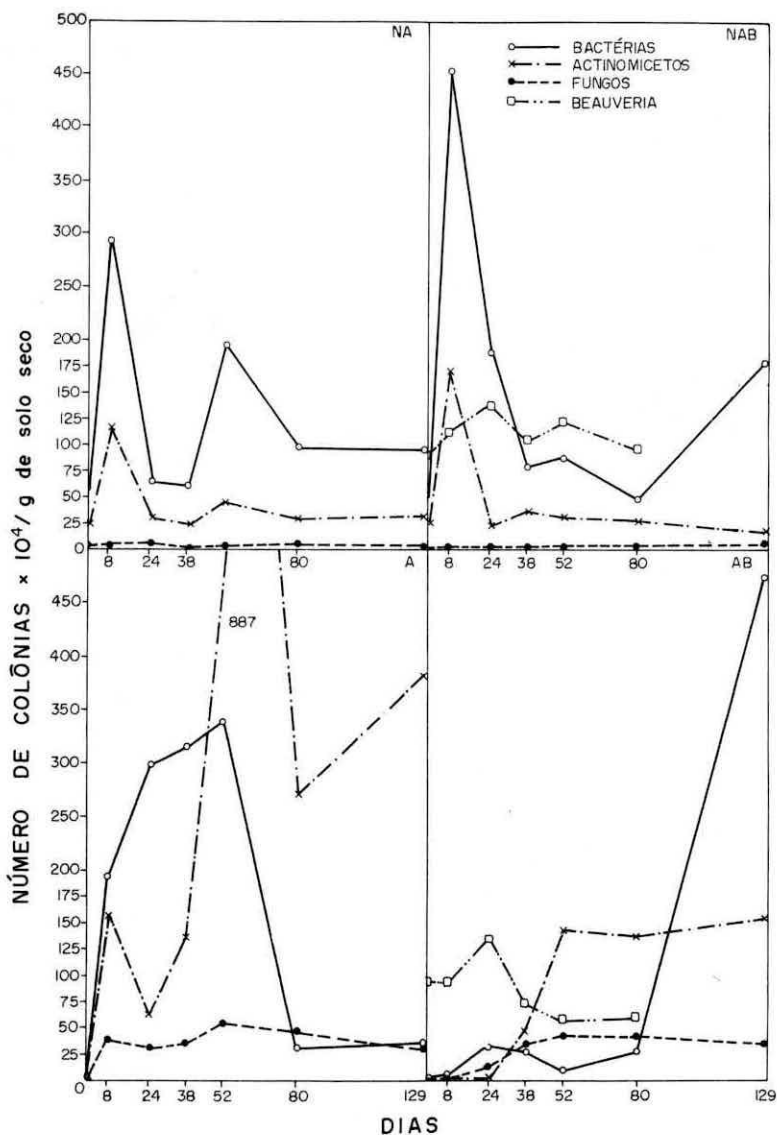


FIGURA 2. Número de colônias de bactérias, actinomicetos e fungos por grama de solo autoclavado (A) e não autoclavado (NA) com (AB e NAB) e sem *Beauveria bassiana* mantido a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e 25% da saturação de água, em vários períodos de amostragem. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

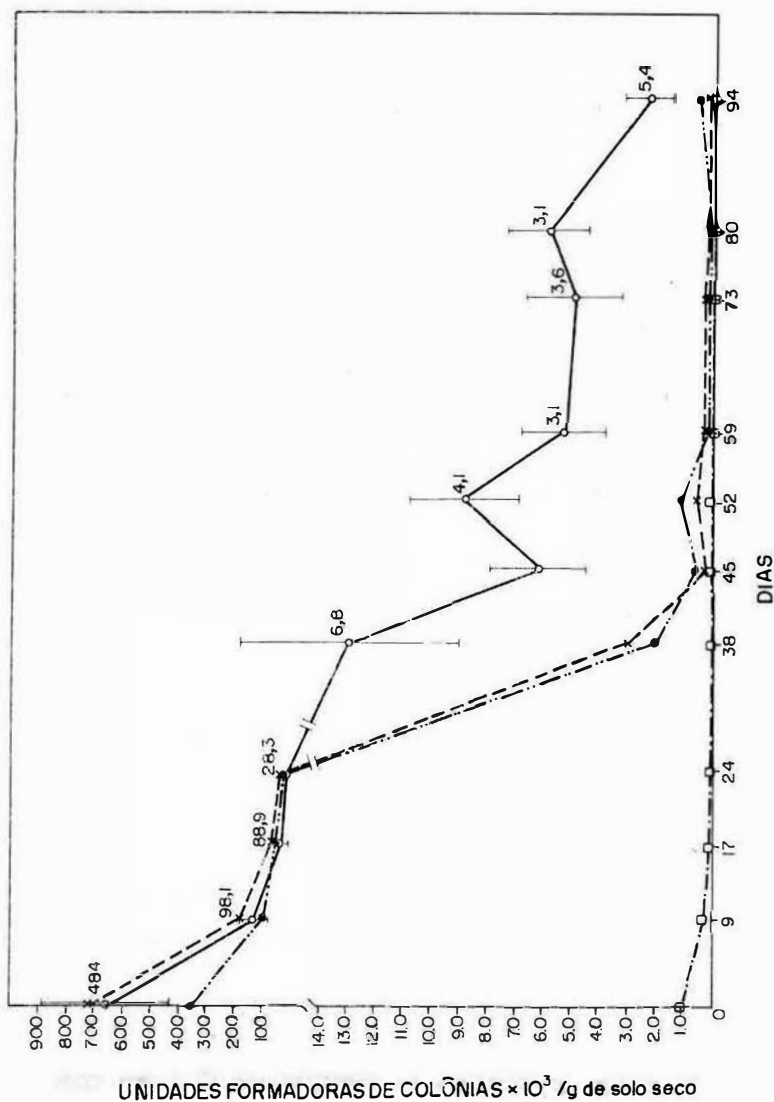


FIGURA 3 - Número de colônias de *B. bassiana* por grama de solo, aplicado na superfície em solo com planta (—●—), aplicado na superfície em solo desnudo (---□---) misturado ao solo desnudo (-.-.-△-.-.-) e sem aplicação (-.-.-◇-.-.-). CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

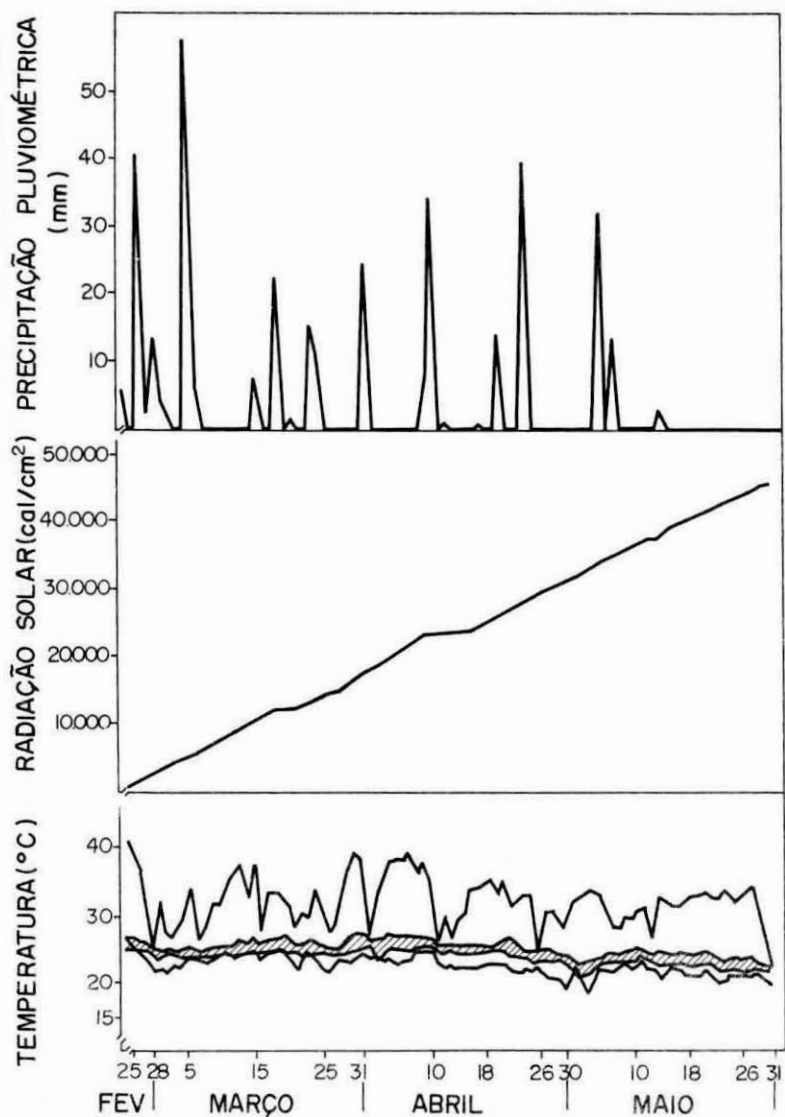


FIGURA 4 - Precipitação pluviométrica, radiação solar e temperatura a profundidade de 5 cm em solo gramado (área hachuriada) e solo desnudo, no período de 05 de fevereiro a 31 de maio de 1986. CNPAF, Goiânia, GO. 1986.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Francisco José P. Zimmermann, pela análise estatística e aos laboratoristas Edmar Cardoso de Moura e Heloísa da Silva Coelho Martins e ao técnico de laboratório Sebastião Martins dos Santos, pela valiosa ajuda na condução dos experimentos.

Esta pesquisa foi financiada, em parte, pelo The Bean-Cowpea Collaborative Research Support Program, da Agência Internacional para o Desenvolvimento (USAID/BIFAD Grant DAN - 1310 - GSS - 6008-00).

LITERATURA CITADA

- AESCHLIMANN, J.P.; FERRON, P.; MARSHAL, M.; SOARES, G. 1985. Occurrence and pathogenicity of *Beauveria bassiana* infesting larval *Sitona discoideus* (COL: CURCULIONIDAE) in the mediterranean region. *Entomophaga* 30:73-82.
- ALVES, S.B. 1986. Epizootiologia. In: S.B. ALVES ed. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, p.28-61.
- CLERK, G.C. 1969. Influence of soil extracts on the germination of conidia of the fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* 13:120-124.
- DAZZO, Y.B. S.d. *Soil microbiology laboratory manual*. East Lansing, Michigan State University Dept. Microbiol., lv.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 1979. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, Rio de Janeiro, R.J. *Manual de Métodos de Análise de Solo*. Rio de Janeiro, lv.
- FARGUES, J. & ROBERT, P.H. 1985. Persistence des conidiospores des hyphomycètes entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Nomuraea rileyi* (F.) Samson et *Paecilomyces fumoso-roseus*. Wize dans le sol, en conditions contrôlées. *Agronomie* 5 (1):73-80.
- HUBER, J. 1958. Untersuchungen zur Physiologie Insekten Tötender Pilze. *Arch. Microbiol.* 29: 257-276.
- KELLER, S. 1983. Die mikrobiologische Bekämpfung des Maikafers (*Melolontha melolontha* L.) mit den Pilz *Beauveria brongniartii*. *Mitteilungen für die Schweizerische Landwirtschaft* 31: 61-64.
- LINGG, A.J. & DONALDSON, M.D. 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 191-200.

- MULLER-KOGLER, E. & STEIN, W. 1970. Gewachshausversuche mit *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. zur infection von *Sitona lineatus* (L.) (Coleopt., Curcul.) im Boden. *Z. Angew. Ent.* 65: 59-76.
- OLIVEIRA, D.P. de 1979. *Sobreviência do Metarhizium anisopliae* (Metsch) sorokin em rizosfera de gramineas forrageiras. Tese Mestrado. UFV. Viçosa, 54p.
- PEREIRA, J.C.R.; DHINGRA, O.R.; CHAVES, G.M. 1979. A selective medium for population estimations of *Metarhizium* in soil. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 72: 495.
- QUINTELA, E.D. 1986. *Estabilidade de Beauveria bassiana* (Bals.) VUILLEMIN (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aeneus* BOHEMAN (Coleoptera: Curculionidae), praga do caupi. Tese Mestrado, 101p. ESALQ, Piracicaba.
- ROBERTS, D.W. & CAMPBELL, A.S. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Misc. Publs. ent. Soc. Am.* 10:19-75.
- ROBERTS, D.W. & WRAIGHT, S.P. 1986. Current status on the use of insect pathogens as biocontrol agents in agriculture: FUNGI. In: R.A. SAMSON, J.M. VLAK, D. PETER, eds. *Fundamental and applied aspects on invertebrate pathology*. Wageningen, Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, p.510-513.
- WATT, B.A. & LEBRUN, R.A. 1984. Soil effects of *Beauveria bassiana* on pupal populations of the colorado potato beetle (Coleoptera: chrysomelidae). *Environ. Ent.* 13:15-18.