

## Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* potenciais para o controle da traça-das-crucíferas

Vando M Rondelli<sup>1</sup>; Dirceu Pratisoli<sup>2</sup>; Edmilson J Marques<sup>1</sup>; Hugo JG dos Santos Junior<sup>2</sup>; João Rafael de CC de Alencar<sup>3</sup>; Gustavo M Sturm<sup>2</sup>; João Paulo P Paes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE; rondellimioffi@hotmail.com; emar@depa.ufrpe.br;

<sup>2</sup>UFES- CCA, Depto. Prod. Vegetal, Alto Universitário s/n, 29500-000 Alegre-ES; pratisoli@cca.ufes.br; hugo@cca.ufes.br;

gustavosturm@hotmail.com; joaopauloppaes@hotmail.com; <sup>3</sup>UNESP, Depto. Fitossanidade, Rodov. Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 Jaboticabal-SP; jralencar@gmail.com

### RESUMO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), é considerada a principal praga das brássicas no mundo, sendo o uso de inseticidas o método mais usado para o seu controle. Assim, o objetivo desta pesquisa foi selecionar isolados de *Beauveria bassiana* com viabilidade para utilização no controle da traça-das-crucíferas. Dezessete isolados e um produto comercial de *B. bassiana* foram testados. Lagartas de segundo instar da traça-das-crucíferas foram pulverizadas com suspensão de conídios na concentração de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>. Para o bioensaio de concentração letal (CL) sete concentrações espaçadas em escala logarítmica foram testadas. Os isolados CCA/UFES-4, 18, 31 e 35 foram selecionados para o bioensaio de CL por causarem mortalidade confirmada superior a 90%. O isolado padrão ESALQ-447 e o produto comercial tiveram resultados semelhantes e também foram selecionados para o bioensaio de CL. Com base nas estimativas da CL<sub>50</sub>, os isolados CCA/UFES-4, 18, 31, ESALQ-447 e o produto comercial podem ser selecionados para utilização no controle da traça-das-crucíferas.

**Palavras-chave:** *Plutella xylostella*, controle microbiano, fungo entomopatogênico, entomologia agrícola.

### ABSTRACT

**Selection of *Beauveria bassiana* isolates potential for diamondback moth control**

Diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), is considered the most important pest of brassicas worldwide and the use of insecticides is the most used method to control this pest. Thus, the objective of this research was to select isolates of *Beauveria bassiana* with viability to control DBM. Seventeen isolates and one commercial product of *B. bassiana* were tested. DBM 2<sup>nd</sup> instar larvae were treated with conidial suspension at concentration of  $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>. For lethal concentration (LC) bioassay seven concentrations spaced on logarithmic scale were tested. The isolates CCA/UFES-4, 18, 31 and 35 were selected for LC bioassay because they caused over 90% confirmed mortality. The standard isolate ESALQ-447 and the commercial product had similar results and were also selected for LC bioassay. Based on the values estimated for LC<sub>50</sub>, the isolates CCA/UFES-4, 18, 31, ESALQ-447 and the commercial product can be selected for use in DBM control.

**Keywords:** *Plutella xylostella*, microbial control, entomopathogenic fungus, agricultural entomology.

(Recebido para publicação em 16 de setembro de 2011; aceito em 6 de julho de 2012)

(Received on September 16, 2011; accepted on July 6, 2012)

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), é considerada a principal praga em todas as regiões que cultivam espécies da família Brassicaceae. Isso devido ao seu alto potencial reprodutivo e ciclo de vida curto, o que lhe proporciona várias gerações por ano (Talekar & Shelton, 1993; Castelo Branco & Gatehouse, 2001; Castelo Branco & Medeiros, 2001; Ulmer *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006). Os prejuízos ocasionados por essa praga são relacionados à alimentação das lagartas, as quais perfuram as folhas causando desvalorização, além de retardar o crescimento da planta e causar sua morte se medidas de controle não forem adotadas (Monnerat *et al.*, 2004).

O método químico é o mais adotado para o controle de *P. xylostella*,

sendo os piretróides e os fosforados os grupos mais utilizados (Castelo Branco & Medeiros, 2001; Monnerat *et al.*, 2004). Quando utilizados sem critérios, os agrotóxicos podem selecionar populações resistentes desta praga às moléculas sintéticas (Godonou *et al.*, 2009), além de causar efeitos tóxicos ao homem e a outros animais (Monnerat *et al.*, 2004). Portanto, em virtude da contaminação ambiental, humana e a crescente preocupação da sociedade em consumir alimentos livres de resíduos químicos surgiu o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que visa à manutenção das pragas abaixo do nível de dano econômico, utilizando para isso, métodos alternativos de controle, como também a associação deles (Gallo *et al.*, 2002).

Entre as táticas de controle da traça-das-crucíferas, o controle biológico

oferece uma solução sustentável para o manejo desta praga nos mais diversos agroecossistemas (Godonou *et al.*, 2009). Dessa forma, o uso de agentes biológicos é considerado essencial para restabelecer o equilíbrio natural. Entre estes se destacam os entomopatogênicos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Medeiros *et al.*, 2006) e algumas espécies de fungos (Silva *et al.*, 2003; Godonou *et al.*, 2009).

*Beauveria bassiana*, uma espécie de fungo entomopatogênico amplamente utilizado no mundo, é encontrado na natureza causando doença e morte de vários insetos. Pesquisas têm demonstrado que este fungo é um agente capaz de infectar insetos em diferentes estágios de desenvolvimento, causando elevados índices de mortalidade, que podem chegar a 100% em condições de

laboratório (Alves, 1998; Rohde *et al.*, 2006). Também pode causar efeitos sutletais diminuindo a viabilidade larval, a fecundidade, a viabilidade de ovos e a longevidade de adultos, como observado por Oliveira *et al.* (2008) para *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Alguns trabalhos têm indicado a importância de *B. bassiana* no manejo integrado de *P. xylostella*, por ser virulento a essa praga (Silva *et al.*, 2003) e também por ser possível a associação com parasitoides, como é o caso de *Oomyzus sokolowskii* (Hymenoptera: Eulophidae) (Santos Junior *et al.*, 2006). Além disso, *B. bassiana* demonstrou apresentar efeito sinérgico quando associado em mistura com o óleo de mamona (Rondelli *et al.*, 2011). Diante disso, e devido à grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos, destaca-se a importância da realização de bioensaios para a seleção de isolados que possam ser utilizados no controle microbiano. Assim, objetivou-se com este trabalho selecionar isolados de *B. bassiana* potenciais para utilização no controle microbiano da traça-das-crucíferas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em laboratório, em câmara climatizada à temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 h e constou das seguintes etapas:

### Obtenção e criação de *P. xylostella*

- Os insetos usados nos experimentos foram provenientes da criação estoque mantida no Laboratório de Entomologia da UFES, originários de plantios de brássicas do município de Alegre (ES), criados em folhas de couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*), de acordo com a metodologia desenvolvida por Barros & Vendramim (1999).

**Obtenção, produção e revigoração dos isolados de *B. bassiana*** - Foram testados 17 isolados de *B. bassiana* oriundos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da UFES e do Laboratório de Patologia de Insetos da USP-ESALQ (Tabela 1), além do formulado comercial Boveril® PM (isolado ESALQ-PL63) (Itaforte,

Itapetininga, SP). Por ocasião dos testes, os isolados foram reproduzidos em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar, acrescido de extrato de levedura e antibiótico (BDAY+A).

A reativação da virulência dos isolados foi feita em besouros da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), oriundos da criação do Laboratório de Entomologia da UFES (Leite *et al.*, 2003). A viabilidade dos conídios foi aferida pelo método da germinação (Silva *et al.*, 2003), sendo considerados viáveis quando apresentaram taxa de germinação superior a 90%.

**Avaliação da patogenicidade de *B. bassiana*** - As suspensões foram preparadas adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) mais espalhante adesivo Tween® (E) 80 a 0,01% (ADE+E), em placas de Petri contendo meio de cultura e o fungo. Estas placas foram submetidas à agitação manual e raspagem com um pincel de cerdas macias esterilizado. Para preparar a suspensão com o formulado Boveril® PM misturaram-se 20 g do produto em 100 mL de ADE+E. As suspensões foram coadas com gaze esterilizada, quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Essa concentração foi escolhida com base em ensaios preliminares. Na testemunha foi utilizada ADE+E.

Dez lagartas de *P. xylostella* de segundo instar foram transferidas para placas de Petri (repetições) de 9,5 x 1,5 cm (diâmetro e altura) revestidas com papel filtro e foram pulverizadas utilizando torre de Potter com pressão de 15 lb  $\text{pol}^{-2}$  e 6 mL de suspensão de cada isolado, correspondendo um depósito médio de 1,62  $\text{mg cm}^{-2}$ . Esta quantidade está de acordo com o recomendado pela International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants/West Palearctic Regional Section (IOBC/WPRS), que é um depósito de 1,5 a 2,0  $\text{mg cm}^{-2}$  (Overmeer & van Zon, 1982). Em seguida, foi colocado na placa um disco foliar de couve manteiga (*B. oleracea* var. *acephala*) de 8 cm de diâmetro com a face abaxial da folha para baixo. As placas foram tampadas e

vedadas com filme de PVC transparente para prevenir a fuga das lagartas. Foram feitos três furos com um estilete pontiagudo no filme de PVC para possibilitar trocas gasosas.

A patogenicidade dos isolados foi diariamente observada, no momento em que os discos foliares eram trocados. Avaliou-se a mortalidade da fase larval até a morte do último inseto, caracterizada pela total imobilidade dos mesmos quando tocados com um pincel de cerdas macias. Foram consideradas vivas as lagartas que puparam. As lagartas mortas foram transferidas para câmara úmida para confirmação do agente causal.

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições (placas de Petri), contendo dez lagartas em cada repetição. A mortalidade corrigida foi calculada em relação à testemunha pela fórmula de Abbott (1925) e a mortalidade confirmada pela porcentagem de insetos nos quais ocorreu conidiogênese. Estes dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAEG, v. 5.0. A sobrevivência larval em decorrência dos isolados selecionados na avaliação da patogenicidade foi comparada aos pares por meio do teste de Log-Rank utilizando-se o Proc LIFETEST do SAS (SAS Institute, 2000).

### Avaliação da concentração letal (CL) dos isolados selecionados

- Foram selecionados para a avaliação da concentração letal os isolados que proporcionaram mortalidade confirmada superior a 90%, além do isolado padrão ESALQ-447 e do formulado comercial (Boveril® PM). Esses isolados foram novamente revigorados na broca-do-café para serem novamente reproduzidos para a produção de conídios. A preparação e a aplicação das suspensões fúngicas foram realizadas adotando-se os mesmos procedimentos descritos na etapa destinada à avaliação da patogenicidade de *B. bassiana*.

Para a estimativa das concentrações letais foram utilizadas sete concentrações espaçadas em escala logarítmica, sendo os limites inferiores e superiores determinados mediante ensaios preli-

minares. Na testemunha foi utilizada ADE+E.

A virulência dos isolados foi avaliada conforme descrito na etapa destinada à avaliação da patogenicidade de *B. bassiana*. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições, contendo dez insetos em cada repetição, totalizando 50 insetos por concentração e 350 insetos por isolado. As concentrações letais foram estimadas utilizando a análise de Probit com o auxílio do programa Polo-PC (LeOra Software, 1987).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Avaliação da patogenicidade de *B. bassiana*** - Os isolados apresentaram diferença quanto à mortalidade corrigida ( $F_{17,90} = 60,12$ ;  $p < 0,0001$ ). Os isolados CCA/UFES-18, CCA/UFES-24, CCA/UFES-31 e ESALQ-610 causaram mortalidade corrigida de 100% das lagartas de *P. xylostella*. Estes, no entanto, não diferiram dos isolados ESALQ-760, CCA/UFES-35, CCA/UFES-4 e CCA/UFES-29, os quais proporcionaram taxa de mortalidade corrigida entre 95,2% e 98,3%. Os demais isolados causaram taxas de mortalidade variando de 11,7%

a 93,8% (Tabela 2).

Considerando a mortalidade confirmada, também houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos ( $F_{17,90} = 20,04$ ;  $p < 0,0001$ ). Os isolados que causaram mortalidade larval superior a 90% foram CCA/UFES-18 (93,9%), CCA/UFES-4 (92,1%), CCA/UFES-35 (91,4%) e CCA/UFES-31 (91,3%), entretanto sem diferir dos tratamentos CCA/UFES-24 (87,0%), Boveril® PM (86,4%), ESALQ-447 (85,8%), CCA/UFES-11 (84,8%), ESALQ-610 (84,2%), CCA/UFES-15 (83,0%) e ESALQ-760 (81,3%). Os demais isolados foram menos eficientes às lagartas de *P. xylostella*, proporcionando taxa de mortalidade confirmada variando de 4,5% a 77,3% (Tabela 2).

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Silva *et al.* (2003) que pulverizaram 2 mL de suspensão de conídios dos isolados ESALQ-634, ESALQ-447, IPA-205, ESALQ-900 e ESALQ-760 de *B. bassiana* na concentração de  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> sobre lagartas de *P. xylostella* e observaram mortalidade de 70 a 96%. Em outro estudo, foi pulverizado 2 mL do isolado ESALQ-447 na concentração de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> em lagartas de *P. xylostella* no terceiro estágio obtendo mortalidade na fase larval de 55%

(Santos Junior *et al.*, 2006). A aplicação de suspensão menos concentrada e a utilização de insetos em estádios mais avançados tendem a proporcionar menores taxas de mortalidade, enquanto que suspensões mais concentradas tendem a causar índices de mortalidade maiores. O volume e a concentração da suspensão de conídios, em pulverização de insetos estão relacionados ao depósito do número de conídios no corpo do inseto. Contudo, quando se utiliza insetos mais velhos, o patógeno tem menos tempo para agir naquele estágio, podendo ser obtidas menores taxas de mortalidade (Silva, 2001).

No estudo de Godonou *et al.* (2009), lagartas da traça-das-crucíferas foram expostas a folhas de couve mergulhadas em suspensão de conídios ( $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) de oito isolados dos fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* por um minuto. Foi observada mortalidade variando de 20 a 94%, sendo os isolados Bba5653 de *B. bassiana* e Ma182 de *M. anisopliae* os que causaram maior mortalidade larval (94 e 90%, respectivamente), sendo a maior mortalidade confirmada observada para o isolado Bba5653 (31%).

A morte das lagartas pulverizadas com os isolados selecionados na concen-

**Tabela 1.** Origem e hospedeiros dos isolados de *Beauveria bassiana* utilizados na pesquisa (origin and hosts of the *Beauveria bassiana* isolates used in the research). Alegre, UFES, 2009.

Isolado	Origem	Hospedeiro ou substrato
CCA/UFES-1	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>Hypothenemus hampei</i>
CCA/UFES-4	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-8	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-11	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-15	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-18	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-24	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-28	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-29	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>H. hampei</i>
CCA/UFES-30	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	<i>Brassolis sophorae</i>
CCA/UFES-31	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	Solo
CCA/UFES-33	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	Solo
CCA/UFES-34	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	Solo
CCA/UFES-35	Laboratório de Entomologia/NUDEMAFI-UFES	Solo
ESALQ-447	Laboratório de Patologia de Insetos/ESALQ-USP	<i>Solenopsis invicta</i>
ESALQ-610	Laboratório de Patologia de Insetos/ESALQ-USP	Solo
ESALQ-760	Laboratório de Patologia de Insetos/ESALQ-USP	<i>Cornitermes cumulans</i>



**Tabela 2.** Mortalidade corrigida e confirmada (%) de lagartas de segundo instar de *Plutella xylostella* provocada por *Beauveria bassiana* ( $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>). Temperatura: 26±1°C, UR de 70±10% e 12 horas de fotofase (corrected and confirmed mortality (%) of 2<sup>nd</sup> instar larvae of *Plutella xylostella* caused by *Beauveria bassiana* ( $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>). Temperature: 26±1°C, 70±10% RH and 12-hour photophase). Alegre, UFES, 2009.

Isolado	Mortalidade	
	Corrigida <sup>1</sup>	Confirmada <sup>1</sup>
CCA/UFES-18	100,0 a	93,9 a
CCA/UFES-24	100,0 a	87,0 a
CCA/UFES-31	100,0 a	91,3 a
ESALQ-610	100,0 a	84,2 a
CCA/UFES-29	98,3 a	77,3 b
CCA/UFES-4	98,2 a	92,1 a
CCA/UFES-35	98,0 a	91,4 a
ESALQ-760	95,2 a	81,3 a
CCA/UFES-11	93,8 b	84,8 a
ESALQ-447	93,6 b	85,8 a
CCA/UFES-34	91,9 b	76,6 b
CCA/UFES-15	91,2 b	83,0 a
CCA/UFES-1	90,0 b	73,2 b
Boveril® PM	86,5 b	86,4 a
CCA/UFES-8	86,4 b	67,0 c
CCA/UFES-28	63,5 c	58,2 c
CCA/UFES-33	46,8 d	39,1 d
CCA/UFES-30	11,7 e	4,5 e
CV (%)	8,5	16,2

<sup>1</sup>Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (means followed by the same letter, in the column, do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability).

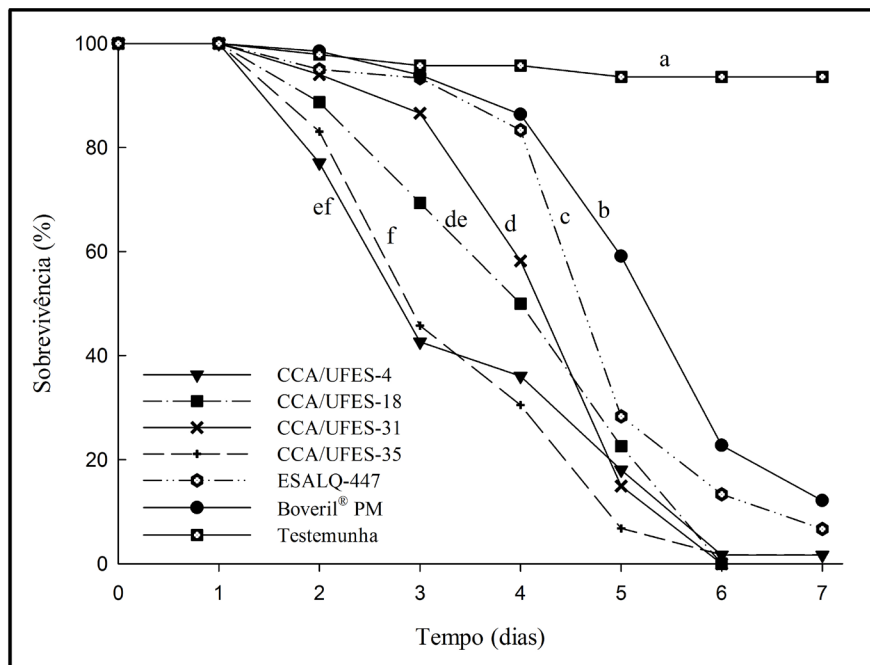
tração de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> inicia-se a partir do primeiro dia. Com o passar do tempo houve acréscimo na mortalidade larval para todos os isolados avaliados. Em média, quatro dias é o tempo necessário para o fungo matar 50% das lagartas. A menor sobrevivência média das lagartas foi observada para os isolados CCA/UFES-35 e CCA/UFES-4 (3,66 e 3,74 dias, respectivamente), sendo a maior sobrevivência média para os isolados ESALQ-447 e o Boveril® PM (5,13 e 5,61 dias, respectivamente). No campo, com a morte precoce do inseto, é provável que menos injúrias sejam feitas nas plantas. Apesar do Boveril® PM ter sido o tratamento que proporcionou menor mortalidade larval, a sua curva de sobrevivência apresentou diferença quando comparada com a da testemunha por meio do teste de Log-Rank ( $\chi^2_{GL=1} = 66,14$ ;  $p < 0,0001$ ). Também houve diferença entre os isolados ( $\chi^2_{GL=5} = 85,62$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 1).

Com relação à sintomatologia, as lagartas mortas pelo fungo normalmente adquiriam coloração rósea, resultante da produção de toxina pelo patógeno, evitando o crescimento de outros organismos sapróbios (Alves, 1998). Posteriormente apresentavam crescimento externo do fungo, geralmente após 24 a 48h, em câmara úmida. Logo após,

**Tabela 3.** Inclinação das curvas de concentração versus mortalidade e concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) de *Beauveria bassiana* sobre lagartas de segundo instar de *Plutella xylostella*. Temperatura de 26±1°C, UR de 70±10% e 12 horas de fotofase (slope of the concentration versus mortality curve and lethal concentrations (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) of *Beauveria bassiana* upon 2<sup>nd</sup> instar larvae of *Plutella xylostella*. Temperature of 26±1°C, 70±10% RH and 12-hour photophase). Alegre, UFES, 2009.

Isolado	Nº <sup>1</sup>	Inclinação da curva <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (conídios mL <sup>-1</sup> ) (IC a 95%) <sup>3</sup>	CL <sub>90</sub> (conídios mL <sup>-1</sup> ) (IC a 95%) <sup>3</sup>	GL <sup>4</sup>	$\chi^2$ <sup>5</sup>
CCA/UFES-4	300	0,7 c	1,69 x 10 <sup>5</sup> b (5,81 x 10 <sup>4</sup> - 3,45 x 10 <sup>5</sup> )	8,83 x 10 <sup>6</sup> ab (3,84 x 10 <sup>6</sup> - 3,52 x 10 <sup>7</sup> )	4	2,5
CCA/UFES-18	304	0,6 c	3,45 x 10 <sup>5</sup> ab (1,69 x 10 <sup>5</sup> - 7,52 x 10 <sup>5</sup> )	4,40 x 10 <sup>7</sup> a (1,11 x 10 <sup>7</sup> - 5,35 x 10 <sup>8</sup> )	4	3,8
CCA/UFES-31	240	1,0 b	4,72 x 10 <sup>5</sup> ab (2,31 x 10 <sup>5</sup> - 8,14 x 10 <sup>5</sup> )	9,15 x 10 <sup>6</sup> ab (4,89 x 10 <sup>6</sup> - 2,29 x 10 <sup>7</sup> )	3	0,1
CCA/UFES-35	311	1,4 a	8,53 x 10 <sup>5</sup> a (5,92 x 10 <sup>5</sup> - 1,16 x 10 <sup>6</sup> )	6,91 x 10 <sup>6</sup> ab (4,60 x 10 <sup>6</sup> - 1,25 x 10 <sup>7</sup> )	4	3,6
ESALQ-447	318	1,0 b	2,39 x 10 <sup>5</sup> b (1,47 x 10 <sup>5</sup> - 3,61 x 10 <sup>5</sup> )	4,42 x 10 <sup>6</sup> b (2,51 x 10 <sup>6</sup> - 1,00 x 10 <sup>7</sup> )	4	4,0
Boveril® PM	262	1,4 a	3,08 x 10 <sup>5</sup> b (1,66 x 10 <sup>5</sup> - 4,55 x 10 <sup>5</sup> )	2,53 x 10 <sup>6</sup> b (1,67 x 10 <sup>6</sup> - 4,99 x 10 <sup>6</sup> )	3	0,8

<sup>1</sup>Número de insetos usados no teste; <sup>2</sup>Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo erro-padrão; <sup>3</sup>Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo intervalo de confiança das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> a 95% de probabilidade (IC a 95%); <sup>4</sup>Número de graus de liberdade; <sup>5</sup>Teste  $\chi^2$  (number of insects used in the test; <sup>2</sup>means followed by the same letter, in the column, do not differ by the standard error; <sup>3</sup>means followed by same letter, in the column, do not differ by the confidence interval of the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> at 95% probability (95% CI); <sup>4</sup>number of degrees of freedom; <sup>5</sup> $\chi^2$  test).



**Figura 1.** Sobrevivência (%) de lagartas de segundo instar de *Plutella xylostella* pulverizadas com isolados de *Beauveria bassiana* e o formulado Boveril® PM ( $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) avaliados até a morte do último inseto. Temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 10\%$  e 12 horas de fotofase. Curvas de sobrevivência representadas com diferentes letras diferem entre si pelo teste de Log-Rank, a 5% de probabilidade (survival (%) of 2<sup>nd</sup> instar larvae of *Plutella xylostella* sprayed with *Beauveria bassiana* isolates and formulated Boveril® WP ( $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) evaluated until the death of the last insect. Temperature of  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  RH and 12-hour photophase. Survival curves represented with different letters differ by Log-Rank test, at 5% probability). Alegre, UFES, 2009.

ocorria a conidiogênese. Isso é essencial para sua rápida propagação dentro do campo de cultivo, pois outras lagartas podem ser infectadas.

Os resultados confirmaram a patogenicidade de todos os isolados, sendo que vários deles possuem grande potencial para a utilização no controle microbiano de *P. xylostella*. No entanto, preconizou-se utilizar no teste de concentração letal os isolados que proporcionaram mortalidade confirmada superior a 90%, os quais foram: CCA/UFES-4, CCA/UFES-18, CCA/UFES-31 e CCA/UFES-35, além do isolado padrão ESALQ-447 (85,8%) e do formulado Boveril® PM (86,4%), visando possibilitar uma comparação com outras pesquisas.

**Avaliação da concentração letal (CL) dos isolados selecionados** - Os menores valores de concentração letal ( $\text{CL}_{50}$ ) foram observados utilizando os isolados CCA/UFES-4 ( $1,69 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), ESALQ-447 ( $2,39 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) e Boveril® PM ( $3,08$

$\times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). No entanto, a  $\text{CL}_{50}$  desses isolados não diferiram dos isolados CCA/UFES-18 ( $3,45 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) e CCA/UFES-31 ( $4,72 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) de acordo com o intervalo de confiança da  $\text{CL}_{50}$  a 95% de probabilidade (IC a 95%). A maior  $\text{CL}_{50}$  foi observada para o isolado CCA/UFES-35 ( $8,53 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), que não diferiu de acordo com o IC a 95% apenas dos isolados CCA/UFES-18 e CCA/UFES-31 (Tabela 3). Maior valor de  $\text{CL}_{50}$  indica menor virulência, assim um isolado menos virulento necessita de maior concentração de conídios para causar a mesma mortalidade de insetos do que um isolado mais virulento. Em geral, os valores de  $\text{CL}_{50}$  obtidos foram baixos, demonstrando a alta suscetibilidade de *P. xylostella* a *B. bassiana*. Dessa forma, o uso de *B. bassiana* para o controle da traça-das-crucíferas provavelmente poderá ser um método econômico por não necessitar de pulverização de suspensão de conídios muito concentrada.

O isolado CCA/UFES-4 foi cinco vezes mais virulento para lagartas da traça-das-crucíferas do que o isolado CCA/UFES-35, demonstrando a importância de estudos de seleção de isolados em laboratório. Silva *et al.* (2003) obtiveram um valor de  $\text{CL}_{50}$  maior para o isolado ESALQ-447 ( $8,6 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) do que o observado neste estudo. Isso provavelmente ocorreu devido à diferença na metodologia de aplicação do fungo, visto que se utilizaram um mini-pulverizador manual, aplicando-se 2 mL de suspensão.

Os tratamentos que proporcionaram menores valores de  $\text{CL}_{90}$  foram Boveril® PM ( $2,53 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) e ESALQ-447 ( $4,42 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). Contudo, a  $\text{CL}_{90}$  desses isolados não diferiram dos isolados CCA/UFES-35 ( $6,91 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), CCA/UFES-4 ( $8,83 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) e CCA/UFES-31 ( $9,15 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) de acordo com o IC a 95%. A maior  $\text{CL}_{90}$  foi observada para o isolado CCA/UFES-18 ( $4,40 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), que não diferiu de acordo com o IC a 95% dos isolados CCA/UFES-4, CCA/UFES-31 e CCA/UFES-35 (Tabela 3).

A curva de concentração versus mortalidade do isolado CCA/UFES-35 e do Boveril® PM foram as que proporcionaram a maior inclinação, de acordo com o erro-padrão da média (1,4) (Tabela 3). Valores altos de inclinação da curva indicam que pequenas variações na concentração do fungo promovem grandes variações na mortalidade de *P. xylostella*.

Não foi possível identificar um isolado mais virulento para *P. xylostella*. No entanto, vários isolados proporcionaram baixo valor de  $\text{CL}_{50}$ . Com isso, outros pontos importantes devem ser estudados, como a produção em larga escala sobre substrato artificial e a realização de testes em condições de campo, uma vez que microrganismos podem reagir diferentemente quando expostos a diferentes condições ambientais (Santos Junior *et al.*, 2009). Em Benin, no campo com temperaturas diárias variando entre 21 e  $31^\circ\text{C}$  e umidade relativa variando entre 66 e 99%, o isolado Bba5653 de *B. bassiana* controlou *P. xylostella*, proporcionando menor número de lagartas vivas por planta e maior peso médio das

cabeças de repolho de aproximadamente três vezes (Godonou *et al.*, 2009). Diversos estudos com outras espécies de lepidópteros comprovam a potencialidade desse fungo no manejo de pragas (Marques *et al.*, 2000; César Filho *et al.*, 2002), também sendo possível a sua associação com inimigos naturais no sistema produtivo das brássicas (Santos Junior *et al.*, 2006).

Novos testes devem ser feitos com os isolados que proporcionaram menor CL<sub>50</sub> sobre a traça-das-crucíferas, para verificar a ação sobre outras pragas-chave das crucíferas, como pulgões e outros lepidópteros, bem como a seletividade a parasitoides da traça-das-crucíferas, também importantes para a manutenção de baixos níveis da praga no campo.

Os isolados CCA/UFES-4, CCA/UFES-18, CCA/UFES-31 e ESALQ-447, bem como o formulado Boveril® PM, possuem viabilidade para serem utilizados no controle da traça-das-crucíferas, podendo ser uma alternativa eficaz ao controle convencional realizado, normalmente, com inseticidas sintéticos, objetivando o manejo da resistência de *P. xylostella* e, sobretudo na agricultura orgânica, na qual não são permitidos agrotóxicos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor e de produtividade em pesquisa ao segundo autor; ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, pelo apoio à pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT WS. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 265-267.
- ALVES SB. 1998. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES SB (ed). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ. p. 289-381.
- BARROS R; VENDRAMIM JD. 1999. Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 469-476.
- CASTELO BRANCO M; GATEHOUSE AG. 2001. A survey of insecticide susceptibility in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. *Neotropical Entomology* 30: 327-332.
- CASTELO BRANCO M; MEDEIROS MA. 2001. Impacto de inseticidas sobre parasitoides da traça-das-crucíferas em repolho, no Distrito Federal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 7-13.
- CÉSAR FILHO E; MARQUES EJ; BARROS R. 2002. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. *Scientia Agricola* 59: 457-462.
- GALLO D; NAKANO O; NETO SS; CARVALHO RPL; BATISTA GC; FILHO EB; PARRA JRP; ZUCCHI RA; ALVES SB; VENDRAMIM JD; MARCHINI LC; LOPES JRS; OMOTO C. 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ. 920p.
- GODONOU I; JAMES B; ATCHA-AHOWÉ C; VODOUHÉ S; KOOYMANC; AHANCHÉDÉ A; KORIE S. 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 28: 220-224.
- LEITE LG; FILHO AB; ALMEIDA JEM; ALVES SB. 2003. Controle de qualidade. In: LEITE LG; FILHO AB; ALMEIDA JEM; ALVES SB. *Produção de fungos entomopatogênicos* (eds). Ribeirão Preto: S.A. Pinto. p. 49-52.
- LEORA SOFTWARE. 1987. *POLO-PC: a user's guide to probit analysis or logit analysis*. Berkeley: Leora Software.
- MARQUES EJ; ALVES SB; MARQUES IMR. 2000. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 303-307.
- MEDEIROS PT; SONE EH; SOARES CMS; DIAS JMCS; MONNERAT RG. 2006. Avaliação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. *Horticultura Brasileira* 24: 245-248.
- MONNERAT RG; LEAL-BERTIOLI SCM; BERTIOLI DJ; BUTT TM; BORDAT D. 2004. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. *Horticultura Brasileira* 22: 607-609.
- OLIVEIRAMAP; MARQUESEJ; WANDERLEY-TEIXEIRA V; BARROS R. 2008. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 30: 220-224.
- OVERMEER WPJ; VAN ZON AQ. 1982. A standardized method for testing the side effect of pesticides on the predaceous mite, *Amblyseius potentillae* (Acari: Phytoseiidae). *Entomophaga* 27: 357-364.
- ROHDE C; ALVES LFA; NEVES PMOJ; ALVES SA; SILVA ER; ALMEIDA JEM. 2006. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology* 35: 231-240.
- RONDELLI VM; PRATISSOLID; POLANCZYK RA; MARQUESEJ; STURMG M; TIBURCIO MO. 2011. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 212-214.
- SANTOS JUNIOR HJG; MARQUES EJ; BARROS R; GONDIM JUNIOR MGC. 2006. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre larvas da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Neotropical Entomology* 35: 241-245.
- SANTOS JUNIOR HJG; MARQUES EJ; POLANCZYK RA; PRATISSOLI D; RONDELLI VM. 2009. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). *Arquivos do Instituto Biológico* 76: 625-631.
- SAS INSTITUTE. 2000. *SAS user's guide: statistic version 8 for windows*. Cary, North Carolina, USA.
- SILVA VCA. 2001. *Patogenicidade de Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok para a traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). Recife: UFRPE. 43p (Tese mestrado).
- SILVA VCA; BARROS R; MARQUES EJ; TORRES JB. 2003. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotropical Entomology* 32: 653-658.
- TALEKAR NS; SHELTON AM. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology* 38: 275-301.
- TORRES AL; BOIÇA JÚNIOR AL; MEDEIROS CAM; BARROS R. 2006. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia* 65: 447-457.
- ULMER B; GILLOTT C; WOODS D; ERLANDSON M. 2002. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. *Crop Protection* 21: 327-331.