

UNIOESTE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

MICHELE POTRICH

ASSOCIAÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES DE MILHO E
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE
***Sitophilus* spp.**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
MARÇO/2006

MICHELE POTRICH

**ASSOCIAÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES DE MILHO E
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE
Sitophilus spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS FRANCISCO ANGELI ALVES

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

MARÇO/2006

“Não é fácil encontrar a felicidade em nós mesmos, mas é impossível encontrá-la em outro lugar.”

Agnes Repplier

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Ivanete Dezem Potrich e Zeferino Roque
Potrich, por serem o Sol da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus pela vida e pela coragem de vivê-la.

Agradeço aos meus pais, Ivanete Dezem Potrich e Zeferino Roque Potrich, e a minha segunda mãe 'nona' Maria Dezem, a quem devo cada sorriso. Agradeço ao carinho (que tanto faz falta) e aos momentos felizes ou não, mas que sempre estiveram unidos, me apoiando e me incentivando. A vocês o meu eterno Amor.

Ao meu namorado Flávio E. Cechin, pela paciência, compreensão, apoio, dedicação, amizade e carinho. Pelos sábados, domingos, férias e feriados que passou me auxiliando no laboratório, e principalmente pelo seu amor. Amo você!

Agradeço à tia Lurdes, ao tio Severino e ao tio Amélio que me ajudaram muito nesta caminhada, cada um ao seu modo. Muito Obrigada!

Ao amigo Everton R. L. da Silva, pelos incansáveis dias de estudo e trabalho, pelas viagens, mau-humor, brincadeiras, risadas, bobearias e acima de tudo pela amizade.

Ao Ederval Cordeiro, Eder, por todas as conversas, risadas e 'futilidades', e principalmente por ser uma pessoa tão maravilhosa. Muito Obrigada, amigo!

À Carla Frasson pelo companheirismo nesses dois anos e pela paciência.

À Natália Mertz, 'Nati', por todas as longas conversas, mesmo sem nexos, altas gargalhadas de madrugada, e em especial, pela amizade e compreensão.

Aos meus amigos de trabalho que direta e indiretamente me auxiliaram, Flávio, Sandra, Eduardo, Eliane e Joselba.

As minhas eternas amigas da faculdade, a famosa "turminha trá-lá-lá", Gisa e Cris, pelo carinho e dedicação à nossa amizade, mesmo à distância.

Agradeço a 'turma' do laboratório: Cris, Nati, Jú, Boni, Nina, Juce, Daian, Dhyego, Lupa, Rose e Marina, o auxílio de vocês foi muito importante para a realização deste trabalho, e as festinhas também!

Á Bióloga Andréia Bonini e ao Prof. Dr. Rodolfo, pelos auxílios estatísticos.

À Jucelaine pelo auxílio nas traduções e pelas horas de conversa.

Agradeço a turminha do Mestrado pelos grupos de estudo, conversas, jantas, churrascos, cervejinhas e caipirinhas: Eder, Everton, Regina, Mary, Laércio, Jorge e Rodolfo.

Agradeço à Prof^a Dr^a Vanda Pietrowski, pelas informações e sugestões para dissertação e pelo auxílio em trabalhos paralelos, além da dedicação e amizade.

Ao prof. Dr. Pedro M.O.J. Neves por fazer parte da banca.

À Noili Batschke pela dedicação, auxílio, paciência e amizade.

Agradeço à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), e ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas e do Mestrado em Agronomia.

À Coodetec, pelo fornecimento dos cultivares de milho.

Finalizo com um agradecimento muito especial ao Prof. Dr. Luis F. A. Alves, pela orientação singular, pelos ensinamentos e pelos dias de dedicação (quase exclusiva). Pelos atendimentos fora de hora, de data e com atrasos. Por apesar de tudo, ter sido muito humano e ter compreendido todas as dificuldades, pela sua amizade. Obrigada Luis!

ASSOCIAÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES DE MILHO E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Sitophilus* spp.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo associar estratégias e métodos de controle visando minimizar os danos provocados por *Sitophilus* spp., visto que este inseto é considerado o principal inseto-praga de milho armazenado. Assim, cultivares de milho resistentes e suscetíveis ao ataque de *Sitophilus* spp. foram selecionados através de testes com chance de escolha, para verificar a preferência alimentar, e sem chance de escolha (confinamento), onde a biologia do inseto foi analisada, bem como os danos ocasionados nos grãos e a perda de peso. Isolados de fungos entomopatogênicos foram selecionados através de avaliações de patogenicidade e comparação da virulência, determinação da concentração letal, crescimento vegetativo, produção de conídios em placa-de-Petri, produção de conídios em arroz e produção de conídios em cadáver. O cultivar suscetível e o cultivar resistente foram associados aos isolados selecionados, sendo que estes foram inoculados nos cultivares previa e posteriormente à infestação por *Sitophilus* spp. Verificou-se que o cultivar CD 3121 apresentou resistência, aumentando a duração do ciclo ovo-adulto, diminuindo o número de insetos emergidos e diminuindo a perda de peso dos grãos, e não-preferência para alimentação por *Sitophilus* spp., enquanto o cultivar CD 307 apresentou suscetibilidade e preferência alimentar para este inseto. Verificou-se que todos os isolados testados foram patogênicos a *Sitophilus* spp., no entanto, diferiram quanto à virulência, sendo que 7 isolados causaram no mínimo 80% de mortalidade confirmada neste inseto. Dentre estes, os 3 que apresentaram maior mortalidade acumulada, ao 5^o dia após a inoculação foram selecionados, sendo Unioeste 4, Unioeste 39 e Esalq 643, no entanto, apenas os isolados Unioeste 4 e Esalq 643 foram selecionados para associação com os cultivares, pois apresentaram os melhores resultados nos testes realizados. Analisando a associação entre os isolados e os cultivares, verificou-se maior controle de *Sitophilus* spp., independente da estratégia de tratamento dos grãos, sendo que a associação causou um aumento na duração do ciclo ovo-adulto, diminuição no número de insetos emergidos, diminuição na porcentagem de grãos danificados e diminuição na perda de peso, tanto para o cultivar CD 3121, quanto para o cultivar CD 307, e para ambos isolados. Contudo, a associação dos isolados com o cultivar CD 3121 destacou-se para controle de *Sitophilus* spp., sendo que as médias apresentadas por este cultivar foram mais expressivas.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Zea mays*, cultivares resistentes, gorgulhos.

ASSOCIATION OF RESISTENT VARIETIES OF CORN AND ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR CONTROL OF *Sitophilus spp.*

ABSTRACT

This work's objective was to associate strategies and control methods, aiming to minimize the damage caused by *Sitophilus spp.*, in as much as it is considered the main pest insect in stored corn. Thus, corn cultivars resistant and susceptible to *Sitophilus spp.* attack were chosen through tests with chance of choice, to verify the feeding preference, and without chance of choice (confinement), where the insect's biology was analyzed, as well as the damage caused to the grains and the weight loss. Isolates of entomopathogenic fungi were selected through pathogenicity evaluations and lethal concentration, vegetative growth, conidia production in petri dishes, rice and in corpses. The susceptible and resistant C were associated to the selected isolates, and these were inoculated in the cultivars before and after the *Sitophilus spp.* infestation. It was verified that the cultivars CD 3121 presented resistance, increasing the duration of the egg-adult cycle, diminishing the number of emerged insects and diminishing the weight loss of the grains, and showed non-preference to feeding by *Sitophilus spp.*, while cultivar CD 307 presented susceptibility and feeding preference to this insect. It was verified that all tested isolates were pathogenic to *Sitophilus spp.* Nevertheless, they differed about virulence, when 7 isolates caused at least 80% of confirmed mortality of this insect. Among these, the 3 that presented higher accumulated mortality at the 5th day after inoculation were selected: Unioeste 4, Unioeste 39 and Esalq 643. However, just isolates Unioeste 4 and Esalq 643 were selected to be associated to the cultivars, because they presented the best results on the realized tests. Analysing the association between the isolates and the cultivars, higher control of *Sitophilus spp.* was verified, independent of the grain treatment strategy. The association caused an increase in the duration of the duration of the egg-adult duration, decrease of the number of emerged insects, decrease of damaged grains percentage and decrease of weight loss, for both cultivars CD 3121 and CD 307, and for both isolates. On the other hand, the isolates association with cultivars CD 3121 stood out for the control of *Sitophilus spp.*, and the averages presented by this cultivar were more expressive.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Zea mays*, resistant cultivar, weevil.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Criação de *Sitophilus* spp. em frascos de vidro vedados com tecido fino, contendo arroz polido 45
- FIGURA 2** Bandeja com recipientes para disposição dos cultivares de milho para experimento com chance de escolha. O ponto central indica o local de liberação dos insetos. 49
- FIGURA 3** Experimento de estratégia de aplicação (Inoculação pré e pós Infestação) e integração dos métodos. 58
- FIGURA 4** Cultivar CD 307, à esquerda grãos sadios e à direita grãos danificados por *Sitophilus* spp. 71
- FIGURA 5** Cultivar CD 3121, à esquerda grãos sadios e à direita grãos danificados por *Sitophilus* spp. 71
- FIGURA 6** Eficiência de diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na mortalidade confirmada de adultos de *Sitophilus* spp. ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 76
- FIGURA 7** Mortalidade confirmada acumulada de adultos de *Sitophilus* spp. por fungos entomopatogênicos..... 78
- FIGURA 8** Porcentagem de mortalidade confirmada diária de adultos de *Sitophilus* spp. por isolados de *B. bassiana* ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 79
- FIGURA 9** Porcentagem média de mortalidade de *Sitophilus* spp., submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*, 10 dias após incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 84
- FIGURA 10** Colônia de *B. bassiana*, A) isolado Unioeste 4, B) isolado Esalq 643 e C) isolado Unioeste 39, cultivado em M.E, 8 dias após incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 87
- FIGURA 11** Crescimento vegetativo e produção de conídios em meio de cultura de isolados de fungos entomopatogênicos ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 90
- FIGURA 12** Conidiogênese de *B. bassiana* sobre Cadáveres de *Sitophilus* spp., 10 dias após inoculação ($26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase). 94

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Relação de cultivares de milho comercial, utilizados no experimento e suas respectivas características físicas..... 44
- TABELA 2** Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e respectiva origem. 47
- TABELA 3** Tratamentos realizados na 3^a fase, compondo as estratégias de aplicação e integração dos métodos, controle biológico e variedades resistentes, para controle de *Sitophilus* spp.. 60
- TABELA 4** Porcentagem média (\pm EP) de atratividade de *Sitophilus* spp. para os diferentes cultivares de milho, em teste com chance de escolha, após 24 horas de exposição. 61
- TABELA 5** Duração média do ciclo biológico, número e peso de adultos de *Sitophilus* spp. emergidos das variedades de milho, em teste sem chance de escolha.. 66
- TABELA 6** Porcentagem média de grãos danificados, porcentagem média de perda total de peso dos grãos de milho e perda média total (g), causados por *Sitophilus* spp., em teste sem chance de escolha..... 70
- TABELA 7** Porcentagem média de mortalidade confirmada de adultos de *Sitophilus* spp. por diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* após 10 dias de incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).. 75
- TABELA 8** Porcentagem média de mortalidade (\pm EP) de adultos *Sitophilus* spp. submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* ao 5^o e ao 10^o dia após inoculação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 82
- TABELA 9** Diâmetro médio e produção média de conídios em colônias (\pm EP) de diferentes isolados de *B. bassiana* em meio de cultura, 8 dias após incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 88
- TABELA 10** Número médio de conídios produzidos em arroz e em cadáveres (\pm EP) de *Sitophilus* spp. ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase)..... 93
- TABELA 11** Efeito da associação dos cultivares CD 3121 e CD 307 com os isolados de *Beauveria bassiana*, Unioeste 4 e Esalq 643, sobre a duração média do ciclo biológico (\pm EP) de *Sitophilus* spp., quando a infestação ocorreu previa ou posteriormente a inoculação dos isolados..... 96
- TABELA 12** Efeito da associação dos cultivares CD 3121 e CD 307 com os isolados de *Beauveria bassiana*, Unioeste 4 e Esalq 643, sobre o

número de *Sitophilus* spp. emergidos (\pm EP) dos grãos de milho, quando a infestação ocorreu previa ou posteriormente a inoculação dos isolados..... 99

TABELA 13 Efeito da associação dos cultivares CD 3121 e CD 307 com os isolados de *Beauveria bassiana*, Unioeste 4 e Esalq 643, sobre o peso médio (\pm EP) dos insetos de *Sitophilus* spp., quando a infestação ocorreu previa ou posteriormente a inoculação dos isolados..... 101

TABELA 14 Efeito da associação dos cultivares CD 3121 e CD 307 com os isolados de *Beauveria bassiana*, Unioeste 4 e Esalq 643, sobre a porcentagem média (\pm EP) de grãos de milho danificados por *Sitophilus* spp., quando a infestação ocorreu previa ou posteriormente a inoculação dos isolados. 103

TABELA 15 Efeito da associação dos cultivares CD 3121 e CD 307 com os isolados de *Beauveria bassiana*, Unioeste 4 e Esalq 643, sobre a perda de peso (\pm EP) dos grãos de milho provocado por *Sitophilus* spp., quando a infestação ocorreu previa ou posteriormente a inoculação dos isolados..... 106

TABELA 16 Efeito da associação dos cultivares CD 3121 e CD 307 com os isolados de *Beauveria bassiana*, Unioeste 4 e Esalq 643, sobre a porcentagem média de perda de peso (\pm EP) dos grãos de milho, provocado por *Sitophilus* spp., quando a infestação ocorreu previa ou posteriormente a inoculação dos isolados. 107

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 MILHO (<i>Zea mays</i> L.)	15
2.2 GORGULHO-DO-MILHO (<i>Sitophilus zeamais</i> Mots., 1855) e GORGULHO-DO-ARROZ (<i>Sitophilus oryzae</i> L., 1763) (Coleoptera: Curculionidae)	17
2.2.1 Caracterização e Biologia.....	17
2.2.2 Danos	19
2.3 MÉTODOS DE CONTROLE	21
2.3.1 Controle Químico	22
2.3.1.1 Inseticidas	23
2.3.2 Terra de Diatomáceas	24
2.3.3 Controle Biológico e Controle Microbiano	26
2.3.4 Variedades Resistentes	31
2.3.4.1 Nutrientes e Substâncias Atrativas	33
2.3.4.2 Dureza	34
2.4 ASSOCIAÇÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO E OUTROS MÉTODOS DE CONTROLE DE INSETOS-PRAGA	36
2.4.1 Associação de Controle Biológico e Variedades Resistentes	36
2.4.2 Associação de Controle Biológico com Controle Químico ou Pós Inertes	39
3 OBJETIVOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 SELEÇÃO DOS CULTIVARES DE MILHO	48
4.1.1 Teste com chance de escolha.....	48
4.1.2 Teste sem chance de escolha (confinamento)	50
4.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	51
4.2.1 Avaliação da Patogenicidade	51
4.2.2 Comparação dos Isolados	53

4.2.2.1 Comparação da Virulência	53
4.2.2.2 Determinação da Concentração Letal (CL ₅₀)	53
4.2.2.3 Crescimento Vegetativo	54
4.2.2.4 Produção de Conídios em placa-de-Petri	55
4.2.2.5 Produção de Conídios em Arroz	55
4.2.2.6 Produção de Conídios em Cadáver de Insetos Adultos	56
4.3 ASSOCIAÇÃO DAS VARIEDADES RESISTENTES E FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO	57
4.3.1 Inoculação pré-infestação	58
4.3.2 Inoculação pós-infestação	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 SELEÇÃO DOS CULTIVARES DE MILHO	61
5.1.1 Teste com chance de escolha	61
5.1.2 Teste sem chance de escolha (confinamento)	65
5.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	74
5.2.1 Avaliação da Patogenicidade	74
5.2.2 Comparação dos Isolados	77
5.2.2.1 Comparação da Virulência	77
5.2.2.2 Determinação da Concentração Letal (CL ₅₀)	80
5.2.2.3 Crescimento Vegetativo	86
5.2.2.4 Produção de Conídios em placa-de-Petri	89
5.2.2.5 Produção de Conídios em Arroz	92
5.2.2.6 Produção de Conídios em Cadáver de Insetos Adultos	93
5.3 ASSOCIAÇÃO DAS VARIEDADES RESISTENTES E FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO	95
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é considerado uma das mais importantes culturas no mundo, sendo que o Brasil está entre os maiores produtores, e o Paraná vem sendo o estado destaque em produção nos últimos anos. No entanto, o milho sofre graves perdas que estão relacionadas ao mau armazenamento dos grãos, predispondo o produto ao ataque de microrganismos, roedores e insetos-praga.

Dentre os insetos-praga, os de maior importância no milho armazenado e, responsáveis pelos maiores danos e prejuízos na sua qualidade são *Sitophilus oryzae* e *S. zeamais*. Estes insetos são pequenos besouros, medindo cerca de 3mm, conhecidos como gorgulho-do-arroz e gorgulho-do-milho, respectivamente.

O ataque desses insetos torna o milho impróprio para a industrialização e para o consumo humano, devido à perda da qualidade nutritiva, perda de higiene e contaminações. O produto final, destinado a alimentação animal, também é afetado, pois além destes fatores, ainda ocorre perda em peso.

Os métodos de controle mais utilizados para estes insetos ainda são os produtos químicos, como o expurgo com fosfina (fosfeto de alumínio ou fosfeto de magnésio), no entanto os estudos demonstram a persistência desses produtos nos alimentos e no meio ambiente, além de serem tóxicos aos aplicadores e selecionarem populações de insetos resistentes.

A demanda mundial por alimentos cada vez mais saudáveis, exige que a qualidade do grão colhido na lavoura seja mantida, e com o mínimo possível de

perdas, além da racionalização quanto à utilização dos produtos químicos. Ressalta-se, dessa forma, a importância do controle microbiano em relação ao controle químico, visto que em países em desenvolvimento, os movimentos da agricultura orgânica e anti-química tendem a oferecer maiores oportunidades ao controle microbiano. No caso específico de *Sitophilus* spp., os fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, mostraram-se promissores como agentes de controle microbiano.

A utilização de cultivares de milho, resistentes a *Sitophilus* spp., também é uma prática utilizada, principalmente, nos Estados Unidos, tendo como vantagens a facilidade do emprego e de associação com outros métodos de controle.

A associação de métodos de controle para a supressão de insetos-praga vem sendo estudada e realizada com sucesso em outras culturas, no entanto, não se tem relato da associação de cultivares de milho resistente e fungos entomopatogênicos para o controle de *Sitophilus* spp., justificando com isso a integração destes métodos, visando maior controle destes insetos, reduzindo a contaminação do alimento e impacto ao ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MILHO (*Zea mays* L.)

O milho é uma das mais importantes culturas no mundo, sendo que em 2004 a produção mundial chegou a 600 milhões de toneladas. No Brasil, esta cultura também é considerada uma das mais importantes, possuindo extensas áreas cultivadas. Segundo dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a área total de milho no Brasil, nas safras 2005/06 foi de 12.490.800 ha. O estado do Paraná tem ficado em primeiro lugar nos últimos 15 anos, e nessa safra chegou a 4.362.200 ha, o que corresponde a 35% da área nacional cultivada com milho (Brasil, 2005 e 2006).

O milho depois de colhido é armazenado em granel, em sacaria ou em espigas com palha. Porém, quando armazenado sem os devidos cuidados, sofre grandes perdas causadas por insetos-praga (Santos, 1993; Toscano et al., 1999; Gallo et al., 2002), sendo considerado o produto com piores condições de armazenamento (Santos, 1993).

Este problema tem origem, segundo Lorini (1999), em diversos fatores, dentre os quais destaca-se a inadequada estrutura armazenadora, em geral, grandes armazéns graneleiros, com sistema deficiente ou inexistente de controle de temperatura e ausência ou deficiência no sistema de aeração. Os grãos são depositados nesses armazéns, onde permanecem até a retirada para o consumo,

não havendo monitoramento de temperatura, de umidade e de presença de insetos, determinando uma perda quanti e qualitativa.

Ainda segundo este autor, os principais cuidados de armazenamento estão relacionados com a limpeza e higiene no local onde o produto será armazenado e de todas as demais estruturas envolvidas neste armazenamento, eliminando resíduos de grãos e pós. Esses resíduos devem ser queimados para que não haja a proliferação de insetos que possam vir a reinfestar as unidades armazenadoras.

Conforme os cuidados tomados no armazenamento, pode-se aumentar ou não a predisposição do produto à deterioração. Essa deterioração depende de vários fatores, dentre eles os agentes biológicos, que englobam bactérias, ácaros, fungos, insetos e roedores. Em grande parte do Brasil, os insetos são considerados as principais pragas destes produtos armazenados, uma vez que a massa de grãos constitui um ambiente ideal para o seu desenvolvimento (Guedes, 1990/1991).

O armazenamento do milho em espigas não é muito utilizado, mesmo sabendo-se que o bom empalhamento atua como proteção natural dos grãos contra os insetos-praga. Essa não utilização desse método de armazenagem deve-se entre outras coisas a maior dificuldade para o controle dos insetos, pelo fato destes penetrarem a espiga em local que os produtos não conseguem atingi-los (Santos, 1993).

2.2 GORGULHO-DO-MILHO (*Sitophilus zeamais* Mots., 1855) e GORGULHO-DO-ARROZ (*Sitophilus oryzae* L., 1763) (Coleoptera: Curculionidae)

2.2.1 Caracterização e Biologia

Sitophilus zeamais e *S. oryzae* são considerados as principais pragas de produtos armazenados no Brasil, principalmente do milho e do arroz, respectivamente. São importantes por serem pragas primárias, pelo seu alto potencial biótico, infestações cruzadas, fácil deslocamento através da massa de grãos, elevado número de hospedeiros e por causarem dano tanto na fase larval quanto na adulta. Embora as duas espécies sejam normalmente encontradas juntas em uma mesma massa de grãos, o mais comum em milho é *S. zeamais* (Ramalho et al., 1976; Vendramim et al., 1992; Santos, 1993; Lorini, 1998 e Lorini, 1999 e Gallo et al., 2002). Este fato também foi relatado por Oduor et al. (2000), que encontrou esta espécie em elevadas proporções nos armazéns de zonas agroecológicas do Kenya, ocorrendo entre 77,7% a 94,7% dos insetos coletados.

Estes insetos atacam diversos grãos armazenados como o trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, triticales, feijão e alimentos beneficiados como macarrão, frutas secas e chocolate (Bianco, 1991; Vendramim et al., 1992; Lorini, 1999 e Gallo et al., 2002). Além destes produtos, Botton et al. (2005) verificaram a ocorrência de *S. zeamais* na cultura da videira no Rio Grande do Sul, atacando as bagas em fase de maturação, observaram também, que todos os parreirais onde foram constatados os danos do inseto, eram próximos a silos ou paióis de milho, que não possuíam o controle desses.

Adultos de *Sitophilus* são pequenos besouros, castanhos-escuros, com manchas avermelhadas nos élitros (visíveis logo após a emergência) que são densamente estriados. As espécies do gênero *Sitophilus* spp. são muito semelhantes em caracteres morfológicos e podem ser distinguidas por pontuações no pronoto ou somente pelo estudo da genitália. Medem em torno de 3mm de comprimento e possuem a cabeça projetada à frente em forma de rostro (característica da família Curculionidae), sendo nas fêmeas mais longo e afilado e nos machos mais curto e grosso. O aparelho bucal é do tipo mastigador, possuindo mandíbulas fortes o suficiente para romperem a dureza dos grãos armazenados (Bianco, 1991; Santos, 1993; Lorini, 1998; Lorini, 1999 e Gallo et al., 2002).

O período de ovo a emergência dos adultos dura, em média, 34 dias, sendo a longevidade dos adultos cerca de 140 dias. O ciclo reprodutivo começa quando a fêmea, utilizando as mandíbulas, perfura um orifício no grão, geralmente na região do embrião, depositando, em seguida, um ovo. A eclosão do ovo se dá após um período médio de quatro dias e tem coloração amarelo-clara, com a cabeça mais escura. Alimentam-se das partes internas do grão, desenvolvem-se, passando por quatro instares larvais e transformam-se dentro do grão em pupa de coloração branca. Em seguida, o inseto atinge a fase adulta que perfura um orifício de forma irregular para sair do grão, acasalando dois a três dias após a saída (Santos & Foster, 1981b; Vendramim et al., 1992; Santos; 1993; Lorini, 1998 e Gallo et al., 2002).

O período para completar o ciclo biológico depende da temperatura, umidade relativa do ar e de características físico-químicas do grão, como umidade, dureza e disposição de nutrientes. Em temperaturas mais elevadas (30°C), com umidade do ar de 70% e grãos dentados e macios, com 13,5% de umidade, o ciclo

biológico pode ser até 10 dias mais curto em relação ao ciclo deste mesmo inseto, mas em condições não tão favoráveis ao seu desenvolvimento (Vendramim et al., 1992 e Santos, 1993).

2.2.2 Danos

Os gorgulhos são classificados como pragas primárias internas, que são aquelas capazes de romper o grão intacto para atingir o endosperma, onde se alimentam. Além disso, o seu desenvolvimento ocorre no interior dos grãos o que possibilita a instalação de outros agentes de deterioração (Matioli & Almeida, 1979a; Guedes, 1990/1991; Santos, 1993 e Lorini, 1999).

O milho atacado por estes insetos é comumente classificado como milho carunchado, que segundo a Abimilho (2002) (Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho), grãos carunchados são furados, broqueados e com túneis, denotando dano característico causado por insetos de grãos armazenados.

As perdas causadas por estes insetos podem equivaler, ou mesmo superar, aquelas provocadas pelos insetos-praga que atacam a cultura no campo, sendo que os danos sofridos pela planta em desenvolvimento podem ser compensados, em parte, por uma recuperação da própria planta danificada, ou pelo aumento da produção das plantas não atacadas, mas os danos sofridos pelos grãos armazenados são definitivos e irrecuperáveis (Santos, 1993).

Os insetos, de maneira geral, são classificados por Lorini (1999) como os maiores causadores de perdas físicas de grãos e subprodutos, além da perda de qualidade. Os danos causados por *Sitophilus* spp., no milho a granel ou em sacarias, pode chegar a 60% em 6 meses, sendo que neste mesmo período a perda

em peso pode ultrapassar 15% (Ramalho et al., 1976 e Matioli & Almeida, 1979a e Embrapa, s.d.).

No caso do milho armazenado, se for encontrado um inseto vivo em um lote de grãos, o produto é desclassificado para a comercialização destinada à alimentação humana, sendo designado para a produção de ração animal (Santos, 1993 e Lorini, 2002b). O grau de tolerância à infestação dos grãos está muito relacionado ao poder aquisitivo da sociedade consumidora, sendo que nos Estados Unidos, Austrália e países europeus, não se tolera a presença de um único inseto na massa de grãos. Já no Brasil, o baixo poder aquisitivo da população, faz com que não se consiga pagar o custo dos métodos de controle que garantam alimentos livres de qualquer inseto e sem resíduos tóxicos, sendo freqüente o encontro destes em cereais comercializados (Santos, 1993).

Os produtos infestados sofrem desvalorização pela perda na qualidade sanitária decorrente da presença dos insetos, pela contaminação por fezes, odores, insetos mortos ou fragmentos destes, e mesmo pelo apodrecimento dos grãos. Os subprodutos também sofrem perdas na qualidade, principalmente a fabricação de farinhas (Vendramim et al., 1992; Lorini, 1999 e Lorini, 2002b). Pelo fato da larva e do adulto do gorgulho se alimentarem dos grãos, a perda em peso é elevada, e quando a perda chega a 25%, compromete significativamente a qualidade nutricional do produto, sendo que o seu valor nutritivo passa a ser considerado praticamente nulo (Ramalho et al., 1976 e Matioli & Almeida, 1979a).

Segundo Matioli & Almeida (1979b), a percentagem de óleo (substâncias graxas e lipídios) perdida no milho pelo ataque do gorgulho difere de acordo com os cultivares. Esta diminuição na quantidade de óleo dos grãos está relacionada à necessidade e a importância das gorduras na fisiologia dos insetos. Estes autores

também verificaram que o índice de acidez do óleo aumentou com o aumento da população de *S. oryzae*, relacionando este fato com a quantidade de excrementos produzidos. Este aumento prejudica a industrialização do produto, visto que ele necessita de um refinamento mais complexo, elevando os custos de produção, e mesmo assim, prejudicando a qualidade final do óleo que chega ao consumidor.

Em relação às proteínas, o consumo feito por *S. oryzae* é baixo, isso se explica, pelo fato de os insetos sintetizarem no próprio organismo (Matioli & Almeida, 1979c).

Segundo este mesmo autor, são grandes as perdas dos grãos em relação aos carboidratos, explicando a preferência dos gorgulhos pelo endosperma da semente, uma região rica nesses nutrientes, pois essas moléculas são importantes como fonte de energia para os insetos. Assim, depois de rompido o tegumento, o teor de glicídios é que passa a determinar a suscetibilidade dos cultivares a *S. oryzae*.

Com o aumento da infestação de *S. zeamais* e *S. oryzae*, ocorrem danos irreversíveis, e com a redução na qualidade, o milho passa a sofrer graves quedas na sua classificação comercial (Caneppele et al., 2003).

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE

Os principais métodos de controle de insetos-praga de grãos armazenados são os métodos físicos, que são divididos em temperatura, umidade relativa do ar, atmosfera controlada, pós-inertes, remoção física, radiação, luz e som (Lorini, 1999).

Destaca também os métodos químicos de controle, que ainda são os mais empregados, enfatizando o tratamento preventivo e curativo de grãos.

No caso dos grãos armazenados, a estratégia preventiva assume maior importância, pela própria dificuldade no estabelecimento de níveis de ação e de metodologias eficientes de amostragem. No entanto, Guedes (1990/91) ressalta que a estratégia preventiva é muitas vezes confundida com controle químico. Estes últimos constituem a base de todo o controle de insetos-praga de grãos armazenados, sendo que poucas táticas diferem desta e poucos lugares vêm realizando controle alternativo, quando então muda-se a base dos produtos utilizados.

Desta forma, além de inseticidas químicos utilizados para o controle de *Sitophilus* spp., as estratégias alternativas empregadas são o controle microbiano e cultivares resistentes, além da associação de métodos de controle.

2.3.1 Controle Químico

Os produtos químicos apresentam vantagens, como o amplo espectro de ação, rapidez de controle, persistência no meio, facilidades de emprego, que não requerem maiores informações sobre a origem das pragas, e em alguns casos, não se verificam resíduos presentes nos alimentos (Van Driesche & Bellows Júnior, 1996 e Sgarbiero et al., 2003). Porém, estes produtos causam impactos ambientais, como contaminações dos solos, alimentos, águas superficiais e subterrâneas, colocando em risco a saúde dos consumidores e dos próprios agricultores, dos animais

domésticos e desequilibra os ecossistemas (Azevedo, 1998; Lacey et al., 2001 e Spadotto, 2002).

2.3.1.1 Inseticidas

Para o controle de *Sitophilus* spp., os produtos químicos ainda são eficientes (Santos & Foster, 1981a), tendo início na década de 50 com o uso do DDT (diclorodifeniltricloreto) em pó para o combate das pragas de milho em espiga. Seu uso foi, no entanto, proibido devido à sua persistência no meio ambiente e ao seu acúmulo no tecido gorduroso animal. Além de causar graves impactos ambientais, muitos relatos surgiram com a preocupação em relação à resistência de insetos-pragas a este produto (Santos, 1993; Kogan & Bajwa, 1999 e Cruz, 2002).

Comprovou-se a resistência de populações de *S. oryzae*, de diferentes estados do Brasil, ao Malathion, Pirimifós Metílico, Fenitrothion e Fosfina, e de *S. zeamais* à Fosfina e Deltametrina (Guedes, 1990/91; Ceruti & Lazzari, 2003). Plazas et al. (2003) verificaram a resistência de populações de *Sitophilus* spp. ao Fenitrothion.

Conforme Santos (1993), o melhor método empregado para se controlar os insetos, tanto a granel como em sacaria, é o expurgo com Fosfina, sendo um método eficiente e barato, no entanto, deve ser realizado por pessoas habilitadas, de acordo com as normas de segurança, para que não ocorra o vazamento de gás durante o processo, o que pode prejudicar a saúde dos aplicadores e contaminar o ambiente.

Hoje, na operação de expurgo, emprega-se a Fosfina (fosfeto de alumínio ou fosfeto de magnésio) em pastilha, no entanto, se não aplicada na concentração recomendada, pode deixar resíduos nos grãos, inutilizando-os para a alimentação (Gallo et al., 2002 e Andrade Júnior et al., 2003).

Vários problemas são ocasionados pelo uso indiscriminado dos produtos químicos, como a seleção de populações resistentes e o surgimento de novos insetos-praga. Paralelamente, surgiu uma grande preocupação por parte da população com a qualidade dos alimentos consumidos, o que pressionou a procura por novas técnicas de controle visando o Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Dessa forma, estudos com o uso de inseticidas de origem vegetal, pós inertes e inimigos naturais vêm sendo realizados, visando o controle de *Sitophilus* spp. (Van Driesche & Bellows Júnior, 1996 e Lacey et al., 2001; Procópio et al., 2003 e Tavares & Vendramim, 2005).

2.3.2 Terra de Diatomáceas

A terra de diatomáceas é um pó inerte proveniente de algas diatomáceas fossilizadas, possuindo dióxido de sílica como seu principal elemento. A sílica provoca desidratação nos insetos, matando-os de um a sete dias. É um produto seguro para o operador e para o consumidor, com ação inseticida duradoura e não perde seu efeito ao longo do tempo. Para o tratamento de milho armazenado, é utilizada na concentração de 1Kg/ton. de grãos (Korunic, 1998; Lorini et al., 2001 e Lorini, 2002a)

A comparação realizada por Lorini et al. (2001) entre terra de diatomáceas e Fosfina para tratamento de grãos de milho, demonstrou a superioridade no uso de terra de diatomáceas já no primeiro ano de utilização. Segundo estes autores, na concentração recomendada, não é prejudicial ao aplicador e ao consumidor e nem aos outros seres vivos, não compromete o meio ambiente, pois não produz resíduos tóxicos, sendo considerado um produto não-químico. Existem produtos comerciais à base de terra de diatomáceas já registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

O contato de *S. granarius* com terra de diatomáceas provoca a perda de peso nesses insetos, além de causar alta mortalidade quando em baixa umidade relativa, sendo que com o aumento da umidade relativa diminui significativamente a mortalidade (Mewis & Ulrichs, 2001).

Arthur & Throne (2003) verificaram a eficácia de terra de diatomáceas em *S. oryzae* e *S. zeamais*, e observaram que tanto as fases internas (larvas e pupas) destes insetos como os adultos emergidos, são suscetíveis a este tratamento, também observaram a redução no número de insetos da geração seguinte. Stathers et al. (2004) também avaliaram a eficácia e persistência de produtos comerciais à base de terra de diatomáceas contra *S. zeamais*, observando que os produtos causaram mortalidade nos adultos e reduziram a progênie.

Três formulações de terra de diatomáceas foram avaliadas por Athanassiou et al. (2004) para controle de *S. oryzae* em grãos de aveia, centeio e triticale, sendo que todas foram efetivas no controle do inseto, chegando a quase 100% de controle, ao 7^o dia após aplicação. Resultados semelhantes foram encontrados por Athanassiou et al. (2005) para controle de *S. oryzae* em trigo e cevada, além da redução significativa da progênie. Após 270 dias, a persistência dos produtos

reduziu, ocorrendo uma diminuição na mortalidade e conseqüente aumento da geração seguinte.

A comparação entre os produtos convencionais e os entomopatógenos é sempre em relação à eficácia e ao custo. Entretanto, o uso do controle microbiano inclui a segurança dos seres humanos e outros organismos, redução de resíduos químicos nos alimentos, preservação de outros inimigos naturais e manutenção da biodiversidade no ecossistema, nem sempre considerados e, desta forma, o controle biológico também serve como alternativa (Lacey et al., 2001).

2.3.3 Controle Biológico e Controle Microbiano

O controle biológico é um fenômeno natural que pode proporcionar uma permanente, harmoniosa e econômica solução. É considerado um fenômeno dinâmico, que sofre a influência dos fatores climáticos, da disponibilidade de alimentos e da associação de diferentes e interdependentes espécies (van den Bosch et al., 1982; Van Driesche & Bellows Júnior, 1996 e Parra et al., 2002a).

Dentre os inimigos naturais, os entomopatógenos têm destaque no controle de insetos-praga de grãos armazenados (Moino Júnior & Alves, 1997; Hidalgo, 1998; Moino Júnior & Alves, 1998; Moino Júnior et al., 1998; Rice & Cogburn, 1999; Padín et al., 2002 e Batta, 2004).

O controle biológico com o emprego de entomopatógenos é chamado controle biológico microbiano ou controle microbiano. As vantagens desse controle estão na especificidade e seletividade, sendo que estes mantêm as populações de parasitóides, predadores e polinizadores, ao contrário do que ocorre quando se

emprega a maioria dos inseticidas químicos. Os patógenos também possuem a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, isto ocorre pois estes podem permanecer na área, no solo ou nos cadáveres (Alves, 1998a; Nardo & Capalbo, 1998; Lacey et al., 2001 e Castrillo et al., 2005).

Os entomopatógenos também podem ser empregados juntamente com inseticidas seletivos e outros métodos de controle, e em geral não selecionam populações resistentes, além de não ocorrer a ressurgência de insetos-praga secundários e terciários como ocorre com a utilização de produtos químicos. A aplicação destes não causa poluição ao ambiente e não são tóxicos para o ser humano e outros animais. Com isso, os produtos tratados com produtos biológicos podem ser mais valorizados comercialmente (Alves, 1998a).

No entanto, algumas desvantagens também são associadas ao controle microbiano, sendo uma delas o espectro de ação, pois muitas vezes o entomopatógeno é tão específico que mata apenas uma espécie de praga. Além disso, a ação dos entomopatógenos é mais lenta e a maioria necessita de condições adequadas de temperatura, umidade, luminosidade e radiação para serem eficientes, devendo contar também, com uma aplicação correta e um armazenamento adequado, para manter sua viabilidade e patogenicidade (Alves, 1998a; Simon, 1999 e Lord, 2005).

Dentre os entomopatógenos, os fungos são os organismos que apresentam maior potencial de uso no controle de *Sitophilus* spp., pois seu modo de ação é baseado, principalmente, no contato do inseto com os conídios, ao contrário dos vírus e bactérias que atuam após a ingestão. Além disso, exigem menor umidade no ambiente se comparados aos nematóides entomopatogênicos (Alves & Lecuona, 1998 e Azevedo, 1998). Os conídios e os esporos dos fungos, têm alta capacidade

de dispersão horizontal, sendo transportados por vários agentes a grandes distâncias (Alves, 1998b; Castrillo et al., 2005).

No Brasil já ocorre a produção massal de fungos entomopatogênicos para o controle de diversos insetos. Esta produção é realizada com o emprego de arroz cozido como substrato. Após a colonização do arroz pelo fungo, a mistura é triturada e comercializada na forma de pó-molhável e/ou suspensão oleosa. A estimativa de vendas das quatro maiores empresas deste setor no Brasil, até 2001, foram equivalentes a 108 mil hectares de área tratada, além das produções de pequenas empresas e empresas que produzem para a própria utilização, como usinas de cana-de-açúcar (Faria & Magalhães, 2001).

Dada a grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos, Alves (1998b) e Dal Bello et al. (2001) destacam a importância da realização de técnicas de bioensaios para a seleção de isolados altamente virulentos, persistentes e com boa capacidade de reprodução. Estas técnicas contribuem para que os fungos entomopatogênicos possam ser utilizados como inseticidas microbiológicos, de maneira eficiente, em concentrações mais baixas e, aplicados também em larga escala, com menor custo. Para *S. zeamais* e *S. oryzae*, os autores Moino Júnior & Alves (1997), Moino Júnior et al. (1998) e Dal Bello et al. (2001), observaram que isolados do mesmo fungo tem diferença na infectividade.

O amplo sucesso dos fungos entomopatogênicos nos programas de controle biológico pode estar associado à essa grande variabilidade genética, sendo considerados como agentes potenciais no controle de insetos-praga (Alves, 1998b e Castrillo et al., 2005).

Os fungos entomopatogênicos com maior potencial para o controle de insetos-praga de grãos armazenados são *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. Apesar de existirem suspeitas com relação à sua segurança, ambos não possuem relatos confirmados de contaminação em seres humanos, sendo considerados seguros para seus aplicadores ou mesmo para os demais organismos vivos, apesar de não serem muito específicos (Pereira et al., 1998a).

Em avaliações realizadas em armazéns no Kenya, foi observada a incidência de insetos de grãos armazenados e de entomopatógenos. O único entomopatógeno encontrado foi *B. bassiana*, sendo presente em menos de 1,0% dos insetos amostrados. Dentre estes, 89,7% eram *S. zeamais*. O fungo teve ocorrências esparsas, sendo encontrado em maiores quantidades na estação seca (Oduor et al., 2000).

Conforme Moino Júnior et al. (1998), isolados de *B. bassiana* causam maior mortalidade em *S. zeamais* quando comparados a isolados de *M. anisopliae*. Eles verificaram que os isolados de *M. anisopliae* não causaram mais que 60% de mortalidade neste inseto. Em contrapartida, 57,4% dos isolados de *B. bassiana* testados causaram mais de 60% de mortalidade.

Da mesma forma, a utilização apenas de *M. anisopliae* para o controle de gorgulhos em trigo armazenado não se mostrou eficiente, causando o máximo de 26,7% de mortalidade (Dal Bello et al., 2001).

Os danos causados por *S. oryzae* em trigo tratado e não-tratado com *B. bassiana*, foram observados por Padín et al. (2002), que constataram que o trigo sem o tratamento teve um dano significativamente maior do que os grãos tratados (perda de peso de 38,3% contra 7,1%, respectivamente).

Além da mortalidade provocada, outra característica importante dos fungos é a conidiogênese sobre os cadáveres, sendo este fator analisado em experimentos

realizados por De La Rosa et al. (1997) com a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*; Luz & Fargues (1998) com *Rhodnius prolixus*; Luz et al. (1999) com bicho-barbeiro, *Triatoma infestans*; Sosa-Gómez & Alves (2000) com a broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*; Neves & Hirose (2005) com *H. hampei*, Alexandre et al. (2006) e Rohde et al. (2006) com cascudinho-de-aviário, *Alphitobius diaperinus*.

O número de conídios produzidos é importante para transmissão de fungos para outros insetos, para isto a influência da temperatura e do processo de inoculação usado têm efeito na esporulação, assim como o isolado utilizado (Luz et al., 1999). Além disso, a produção de conídios sobre cadáver é um dos fatores mais importantes em campo, por serem focos de disseminação, sendo necessário que o fungo selecionado tenha boas qualidades em todos os fatores analisados, como esporulação, crescimento vegetativo, produção de conídios em cadáver e produção de conídios em arroz (Neves & Hirose, 2005).

A eficiência dos entomopatógenos e o volume de áreas tratadas têm aumentado sua credibilidade, porém sua eficiência ainda é colocada em dúvida por muitos produtores (Lacey et al., 2001 e Parra et al., 2002b). Contudo, o melhoramento dos entomopatógenos, através de estudos genéticos e bioquímicos, sua produção, formulação, o melhor entendimento de como eles se mantêm em sistemas integrados e suas interações com o desenvolvimento de outros componentes do MIP, farão com que todas as suas vantagens (eficácia, seletividade e segurança) e não simplesmente sua comparação com os inseticidas químicos, sejam evidenciadas, sendo aceito de forma mais ampla.

2.3.4 Variedades Resistentes

Em países como os Estados Unidos, onde o gorgulho é considerado um dos insetos-praga mais importantes do milho, há relatos da utilização de cultivares resistentes desde a década de 90. A utilização destes cultivares chegou a reduzir a infestação, em alguns casos em mais de 40% (Vendramim et al., 1992).

As plantas resistentes a insetos são consideradas um método ideal de controle, pois possuindo a resistência incorporada ao seu genoma possibilita a manutenção da praga em níveis inferiores aos níveis de dano, não causa impactos ambientais, evita qualquer forma de contaminação, não tem custo adicional e pode ser empregado com qualquer outro método de controle. É considerada uma prática excelente para pragas nocivas em plantações de ciclo curto, tendo muitos casos de sucesso já relatados (Lara, 1991 e Gallo et al., 2002). Visando o controle de *Sitophilus* spp. em grãos armazenados, muitos autores realizaram trabalhos selecionando e/ou identificando cultivares de milho resistentes a este inseto.

A resistência do grão de milho a *Sitophilus* spp. resulta de uma ação conjunta dos mecanismos antibiose e antixenose, e a fonte de alimento na fase adulta é um fator importante para a reprodução deste inseto em relação àquela durante a fase jovem (Santos & Foster, 1983).

Santos & Foster (1981a) avaliaram a resistência do tipo preferência alimentar. Para isto, *S. zeamais* foi liberado em uma mistura de grãos resistentes e suscetíveis, previamente selecionados e marcados. Observaram que o inseto foi capaz de distinguir os diferentes grãos, escolhendo o cultivar suscetível para sua alimentação.

A preferência alimentar de *Sitophilus* spp., nos experimentos com livre chance de escolha, indica efeito atrativo para todos os cultivares, porém, com diferenças significativas no percentual de insetos encontrados em cada material. Verificando dessa forma a existência de repelência para a alimentação em alguns cultivares de milho (Santos & Foster, 1981b; Toscano et al., 1999 e Guzzo et al., 2002).

Com o objetivo de analisar os danos provocados por *S. oryzae* em milho, Mاتيoli (1981) realizou testes de confinamento, e observou que os danos causados pelo inseto em diferentes cultivares de milho apresentaram diferença significativa. No cultivar suscetível, o período de armazenamento e os níveis de infestação contribuíram para o aumento no número de grãos perfurados, para a perda de peso na massa de grãos e para o percentual de resíduos produzidos. A perda de peso dos grãos atacados é um fator muito importante, pois além do aspecto econômico, também indica um fator de resistência. Essas diferenças em relação aos cultivares também foram observadas com *S. zeamais* por Boiça Júnior et al., (1997) e Toscano et al. (1999).

Para a análise da biologia de *Sitophilus* spp. em diferentes cultivares de milho, também são realizados testes de confinamento. Assim, Ramalho et al. (1977) afirmam que existe uma relação entre duração do ciclo ovo-adulto e o número de adultos de *Sitophilus* spp. emergidos, de forma que quanto mais suscetível o milho, maior é o número de insetos emergidos e menor é o tempo que demoram a emergir.

Neste teste procura-se confirmar a hipótese de que o menos preferido no teste com chance de escolha não é adequado para o desenvolvimento de *S. zeamais*, e para isso, avalia-se a emergência e o desenvolvimento dos insetos. Desta forma, Santos & Foster (1981b) verificaram que os cultivares menos

preferidos tiveram menor emergência de *Sitophilus* spp., sendo portanto, resistentes a estes. Por outro lado, os mais preferidos apresentaram uma emergência maior, sendo também os mais suscetíveis ao inseto, confirmando a hipótese anterior. No entanto, Boiça Júnior (1997) e Guzzo et al. (2002) observaram que não houve diferença quanto ao ciclo de vida de *S. zeamais*, quando confinados nos cultivares que apresentaram ou não apresentaram preferência alimentar.

Lara (1991) e Toscano et al. (1999) atribuíram à resistência de um cultivar diversas características físicas, químicas e morfológicas que podem atuar de forma agrupada, ou mesmo isoladamente, atraindo ou repelindo o gorgulho.

Observa-se desta forma, que os fatores que determinam a resistência ou a suscetibilidade dos cultivares de milho ainda não são bem definidos, mas os estudos se baseiam principalmente nos nutrientes e substâncias atrativas e, na dureza dos grãos.

2.3.4.1 Nutrientes e Substâncias Atrativas

A ausência ou o desequilíbrio de nutrientes essenciais ou não, pode interferir na adequabilidade do alimento para os insetos. A vantagem de procurar cultivares resistentes está no fato destes reduzirem a taxa de oviposição, o desenvolvimento e em alguns casos provocarem mortalidade (Guedes, 1990/91).

Tipping et al. (1987) ao realizar um experimento para avaliar a capacidade atrativa de extratos de diferentes materiais de milho, verificaram que não houve interferência na atratividade de *S. zeamais*, nem relação entre atração e oviposição.

Ao contrário destes, Boiça Júnior et al. (1997) descrevem que os grãos possivelmente apresentam algum fator de resistência para a não-preferência, ou mesmo a liberação de alguma substância atrativa para a preferência à oviposição e à alimentação dos insetos, como odor e sabor, explicando assim a atratividade por alguns dos materiais. Também Toscano et al. (1999) descrevem que os cultivares podem apresentar uma possível substância alimentar que interfere ou estimula a alimentação destes insetos.

Verificou-se que o conteúdo de proteínas e de carboidratos não influencia a resistência dos cultivares ao ataque de *S. zeamais*, no entanto, os lipídios, seguidos das unidades inibidoras de amilase, são os que mais influenciam. Estes apresentam relação positiva com o ciclo biológico da praga, de forma que o aumento no conteúdo destes compostos nos grãos ocasiona o aumento na duração do ciclo biológico da praga, conseqüentemente, menor número de gerações (Marsaro Júnior et al., 2005b).

2.3.4.2 Dureza

Analisando fatores que pudessem estar ligados à resistência ou suscetibilidade de alguns cultivares, a dureza não foi atribuída como fonte de resistência do milho, conforme Ramalho et al. (1976). Pois, como descrito por eles, quando empalhados podem ser considerados resistentes, pois só expõem a parte costal que é dura. Porém, quando este mesmo material encontra-se debulhado, todas as partes estão expostas, sendo a região do embrião a mais mole e, conseqüentemente, a preferível para a alimentação e oviposição do gorgulho, neste

caso, não sendo mais considerada resistente, pois passa a conferir uma preferência alimentar ao inseto.

Em contrapartida, Tipping et al. (1987) ressaltam que as prováveis causas da não-preferência estão associadas à dureza do grão, constituindo dessa forma uma barreira mecânica, sendo que a natureza química ou física do pericarpo seria um dos fatores responsáveis pelas diferenças na alimentação e oviposição.

A resistência de 'Tripsacorn' (um híbrido desenvolvido a partir de teosinte e um cultivar primitivo de milho) também é atribuída à sua dureza, o que é considerado um mecanismo primitivo de defesa contra insetos e outras pragas. Desta forma, existe a proposta de se procurar estes genes de resistência para a transferência para o milho (Throne & Eubanks, 2002).

Verifica-se que muito tem-se procurado para a identificação e seleção de cultivares de milho resistentes, assim como o desenvolvimento dessas, afim de efetivar um completo controle de *Sitophilus* spp. (Vendramim, 2002).

Vale ressaltar que cultivares resistentes não estão incluídos dentro do conceito de controle biológico, pois este é um processo de nível populacional (Garcia et al., 1988). No entanto, podem favorecê-lo, e com base nisso, muitos pesquisadores desenvolveram trabalhos com a integração de métodos de controle. Segundo Lorini (2002a), a integração de diferentes métodos de controle é uma prática essencial para se obter sucesso na supressão de insetos-praga de grãos armazenados.

2.4 ASSOCIAÇÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO E OUTROS MÉTODOS DE CONTROLE DE INSETOS-PRAGA

Dentre os métodos, visando o controle de *Sitophilus* spp., passíveis de associação com controle biológico, incluem-se variedades resistentes, controle químico e pós-inertes.

2.4.1 Associação de Controle Biológico e Variedades Resistentes

Segundo Lara (1991) e Gallo et al. (2002), os métodos mais adequados para a associação com cultivares resistentes são o controle cultural, o biológico e o químico, porém, no contexto deste trabalho, maior ênfase é dada à associação dos cultivares resistentes e o controle biológico, sendo que segundo Kogan (1988)¹ citado por Guedes (1990/91), uma estratégia de controle ideal seria aquela embasada em medidas preventivas, como resistência de plantas e controle biológico, que assegurariam um equilíbrio favorável ao meio ambiente. Além disso, Lacey et al. (2001) afirmaram que o sinergismo dos agentes de controle microbiano em associação com técnicas de controle, como a resistência de plantas, são práticas importantes para a redução ainda maior de resíduos químicos nos produtos.

Em trabalhos com insetos-praga de produtos armazenados, Rice & Cogburn (1999) misturaram conídios de *B. bassiana* nas variedades de arroz marrom e selvagem, e verificaram a redução na emergência da progênie de *S. oryzae*, em 83% e 98%, respectivamente, nas maiores concentrações, quando comparados às suas testemunhas. Assim, a virulência do fungo foi maior no arroz selvagem do que

¹ KOGAN, M. Integrated pest management: theory and practice. Entomol. exp. appl., v.49, p.59-70, 1988.

no arroz marrom, sendo que no primeiro caso, 7 dias após a inoculação, a mortalidade chegou a 94,1%, e no segundo caso chegou a 75%. Os autores também ressaltam que *B. bassiana* é efetivo no tratamento de pragas de grãos armazenados, principalmente em produtos que já tenham uma certa barreira à procriação destes, sendo então, um método alternativo de controle de pragas de produtos armazenados.

Utilizando-se um genótipo resistente de tomateiro e a associação com *B. bassiana* para o controle de *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro), observou-se aumento na mortalidade do inseto quando comparado a ambos os tratamentos utilizados isoladamente. Em alguns casos, a mortalidade causada pela associação dos fatores foi maior que a soma das mortalidades causadas pelos fatores genótipo e *B. bassiana* isoladamente, ocorrendo, nesse caso, sinergismo dos fatores (Giustolin et al., 2001a).

A redução na população do inseto-praga através da associação de fungos entomopatogênicos e variedades resistentes, também foi observada por Hatting et al. (2004). Estes autores associaram *B. bassiana* com variedades resistentes de trigo sob condições de campo e observaram redução de 65% na população do pulgão *Diuraphis noxia* quando comparado à testemunha, sendo que esta constatação foi feita no primeiro e no segundo ano da cultura.

Em experimentos integrando *Bacillus thuringiensis* e genótipos de tomate resistentes, observou-se que a duração da fase larval de *T. absoluta* foi prolongada e a sobrevivência reduzida, aumentando a eficiência no controle deste inseto, o que também indica a ocorrência de sinergismo entre os fatores. O experimento demonstrou que a eficiência do entomopatógeno pode ser aumentada se as lagartas forem alimentadas por longo período em plantas resistentes (Giustolin et al., 2001b).

Em alguns casos, as variedades favorecem o desenvolvimento do inseto, diminuindo a sua suscetibilidade ao entomopatógeno, como ocorre com o bicho-da-seda, *Bombyx mori*, que quando alimentado com as amoreiras das variedades Miura e Calabreza não atingem 50% de mortalidade se expostos ao vírus da poliedrose nuclear de *Bombyx mori* (Sosa-Gómez et al., 1991).

Os efeitos da aplicação de entomopatógenos associados com outros métodos de controle podem ser divididos, segundo Sosa-Gómez et al. (1998), em três classes:

1. Diminuição do substrato ou do hospedeiro: causa a diminuição da população da praga pelo entomopatógeno, no entanto, afeta os níveis populacionais de outros agentes de controle;
2. Antagonismo: é a ação direta dos entomopatógenos sobre outros agentes que podem estar presentes ao mesmo tempo no hospedeiro infectado ou ocorrendo de outra forma, ou seja, esses organismos competem entre si pelo mesmo hospedeiro, sendo que um acaba por inibir o outro;
3. Sinergismo ou Efeito Aditivo: é quando um patógeno se beneficia da presença de outro agente de controle biológico ou cria condições no hospedeiro para um melhor desenvolvimento de outro agente biológico.

Além dos trabalhos envolvendo a associação entre entomopatógenos e variedades resistentes, também são realizados trabalhos com a associação de predadores e parasitóides com essas plantas.

Na associação de genótipos resistentes de sorgo e o predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Cocinelidae), verificou-se que a integração destes métodos no manejo do pulgão *Schizaphis graminum* é compatível e viável, pois o genótipo resistente afeta negativamente a biologia do pulgão (Santos et al., 2003). Em

experimento semelhante, Figueira et al. (2003) conduzindo com o predador *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Crysopidae), obtiveram igual sucesso, com redução de 83% nos danos do pulgão quando realizada a associação dos dois métodos de controle.

Ambos autores atribuem às plantas resistentes a presença de fatores que afetam a biologia dos insetos, prolongando o seu desenvolvimento, reduzindo seu peso e alterando o crescimento populacional. Com isso se tornam mais suscetíveis ao ataque por parte de seus inimigos naturais, por ficarem mais tempo expostos.

No entanto, em experimentos conduzidos por Wanderley et al. (2003) observou-se que fêmeas do parasitóide *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) conseguiram diferenciar larvas da broca da batata-doce, *Euscepes postfasciatus* (Coleoptera: Curculionidae), criadas em cultivares resistentes e suscetíveis, preferindo parasitar as brocas que se desenvolveram no cultivar suscetível, pois estas apresentaram maior quantidade de nutrientes.

Em relação à interação entre a resistência de plantas e o controle biológico, pode-se inferir que o impacto destes cultivares no agroecossistema pode variar desde efeitos antagônicos até complementares (Waquil et al., 2002).

2.4.2 Associação de Controle Biológico com Controle Químico ou Pós Inertes

Segundo Lorini (1999), o controle biológico deve ser entendido como estratégia de controle de pragas durante o armazenamento. Dal Bello et al. (2001) também propõem que o controle biológico seja um método alternativo de controle de insetos de grãos armazenados, podendo dessa forma ser empregado com outros

métodos. Dentre estes, o autor propõe a associação dos fungos, *M. anisopliae* e *B. bassiana*, ou destes com inseticidas químicos, podendo ter como vantagens o controle de muitas espécies de insetos, ser mais consistente e até mesmo ter um controle maior sob diversas variações ambientais.

Testando formulações do fungo *B. bassiana* na concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/g com talco em pó, em 5 e 20g/Kg de grãos de milho, Hidalgo et al. (1998) verificaram, respectivamente, 77,5% e 90% de mortalidade em *S. zeamais*.

Assim como Dal Bello et al. (2001), Padín et al. (2002) sugerem a utilização de fungos entomopatogênicos juntamente com inseticidas de fumigação, para a redução das concentrações destes produtos, amenizando os resíduos nos alimentos.

A associação de formulações de *M. anisopliae* em carvão vegetal e em cinzas causou uma mortalidade de 73,3% e 80%, respectivamente, em *S. oryzae* quando aplicados antes da infestação, não apresentando diferenças para aplicações posteriores. Neste caso, os efeitos são sinergistas, causando maior mortalidade do que quando são utilizados isoladamente. Observou-se também que estes dois tratamentos reduziram os danos causados nos grãos de trigo, além de aumentarem o ciclo de desenvolvimento dos insetos (Batta, 2004).

Em experimentos associando *B. bassiana* e terra de diatomáceas, visando o controle de insetos-praga de grãos armazenados, *Rhyzopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis* e *Cryptolestes ferruginensis*, verificou-se efeito sinérgico (Lord, 2001).

Da mesma forma, avaliando o aumento na eficácia do fungo *B. bassiana* para o controle de *Tribolium castaneum*, Akbar et al. (2004) realizaram um experimento associando terra de diatomáceas ao fungo, e observaram que não

houve aumento na mortalidade na fase adulta. No entanto, na fase larval ocorreu aumento na mortalidade quando se compara a mistura com o fungo isoladamente, observando um efeito aditivo nesta associação, que é explicada pelo fato da terra de diatomáceas danificar a cutícula do inseto, permitindo desta forma uma facilidade para o fungo penetrar no corpo do inseto, além de proporcionar nutrientes viáveis para sua a germinação.

A utilização do controle natural de pragas, causa muitas vezes a diminuição drástica do número de aplicações de inseticidas químicos, o que traz benefícios para o meio ambiente, para os produtos obtidos, para a qualidade de vida e saúde dos agricultores.

O controle integrado é uma técnica dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP), que é uma estratégia de controle que utiliza táticas em harmonia com o ambiente, sendo que o objetivo é manter os insetos a níveis populacionais que não afetem economicamente a cultura e que reduzam o uso excessivo de inseticidas químicos, atenuando o impacto dos insetos-praga. Sua aplicação prática é ainda restrita, variando grandemente de acordo com a região, a cultura e do apoio do governo em relação aos estímulos dados a adoção desta medida de controle. Além destes fatores, outra resistência quanto ao MIP é a necessidade de um grande número de informações (Nardo & Capalbo, 1998; Pereira et al., 1998b; Kogan & Bajwa, 1999 e Vendramim, 2002).

A integração de diferentes métodos de controle é uma prática essencial para se obter sucesso na supressão de insetos-praga de produtos armazenados. Ressalta-se ainda, que a resistência destes insetos a inseticidas, exige o uso integrado de controles, sendo esses métodos passíveis de cada unidade (Lorini, 1998 e Parra et al., 2002b).

A associação destes métodos pode resultar em um controle mais efetivo, já que pode ocorrer sinergismo, sendo que até pouco tempo eram escassos os trabalhos com esta interação, restringindo-se apenas a cultivares resistentes ou ao controle biológico, e não aos dois no mesmo manejo.

A variação no efeito resultante do uso associado se deve ao fato de que além dos efeitos independentes provocados por esses dois métodos, existem aqueles resultantes das interações tritróficas, envolvendo a planta, o inseto-praga e o inimigo natural (Vendramim, 2002). Ressalta-se que a influência da cultivar resistente sobre *Sitophilus* spp., em geral, provoca uma alteração biológica negativa, podendo torná-lo mais suscetível ao ataque dos fungos entomopatogênicos.

Baseando-se nos fatores citados, associando ao grande potencial agrícola do Brasil e sabendo, que um cultivar resistente de milho integrado a um fungo entomopatogênico pode influenciar na melhoria do controle de *Sitophilus* spp. justifica-se a integração desses dois fatores ainda não testados. Sendo que o emprego de cultivares resistentes, sob o ponto de vista fitossanitário, é provavelmente uma das chaves para o controle de pragas.

3 OBJETIVOS

Avaliar diferentes cultivares de milho quanto à resistência ao ataque de *Sitophilus* spp.

Selecionar isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* virulentos a *Sitophilus* spp.

Avaliar a eficiência do controle associado de variedades resistentes de milho e controle microbiano para controle de *Sitophilus* spp. em grãos armazenados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Zoologia de Invertebrados da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* de Cascavel. Para isto, foram utilizadas sementes de milho produzidas na safra 2004/2005, não submetidas a qualquer tratamento fitossanitário, visando controlar insetos e/ou fungos, estas foram fornecidas pela COODETEC – Cooperativa Central Agrícola, Cascavel, PR (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de cultivares de milho comercial, utilizados no experimento e suas respectivas características físicas.

Cultivar ¹	Tipo de híbrido	Tipo de grão	Cor do grão
OC 705	Duplo	Semi-duro	Alaranjado
CD 3121	Simples	Semi-dentado	Amarelo
CD 304	Triplo	Duro	Alaranjado
CD 306	Triplo	Semi-duro	Alaranjado
CD 307	Simples	Semi-dentado	Amarelo
CD 308	Duplo	Semi-duro	Alaranjado

Fonte: Coodetec (2005)

¹A citação dos materiais não implica em endosso por parte dos autores

As sementes foram previamente inspecionadas, eliminando-se impurezas ou grãos imperfeitos que pudessem comprometer o experimento. Em seguida, foram

armazenadas por 10 dias em freezer a -10°C , para eliminar os insetos nas diferentes fases de desenvolvimento, eventualmente presentes na massa de grãos. Após este período, as sementes foram secadas pelo método de estufa e a umidade final ficou em torno de 13%.

Adultos de *Sitophilus* spp., utilizados em todas as fases do experimento foram provenientes da criação do próprio laboratório, com idade entre 30 e 60 dias, não sexados, alimentados com grãos de arroz polido, para que não apresentassem condicionamento pré-imaginal por um determinado cultivar de milho (Figura 1).



Figura 1. Criação de *Sitophilus* spp. em frascos de vidro vedados com tecido fino, contendo arroz polido.

Dezesseis isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e dois de *Metarhizium anisopliae* provenientes do banco de patógenos do Laboratório

de Zoologia da Unioeste – *Campus Cascavel* (Tabela 2), foram reativados em larvas de cascudinho-de-aviário (*Alphitobius diaperinus*). O procedimento foi realizado pela inoculação de insetos sadios em suspensões dos isolados, e após a conidiogênese sobre o inseto, cada isolado foi cultivado em M.E. (meio de esporulação) (Alves et al., 1998) e os conídios recolhidos e armazenados em freezer a -10°C. Essa padronização foi realizada para a reativação dos fungos e teve como objetivo incrementar a virulência e diminuir o tempo médio de mortalidade dos insetos, como foi observado por González et al. (1993).

Tabela 2: Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e respectiva origem

Isolados	Hospedeiro original ou substrato	Local de origem
Unioeste 1*	<i>Astylus variegatus</i>	Cascavel, PR
Unioeste 3*	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Cascavel, PR
Unioeste 4*	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel, PR
Unioeste 5*	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel, PR
Unioeste 22**	Solo, Plantação de erva-mate	Cascavel, PR
Unioeste 25*	Solo, Plantação de erva-mate	Cascavel, PR
Unioeste 26*	Solo, Plantação de erva-mate	Cascavel, PR
Unioeste 36*	Coleoptera: Chrysomelidae	Cascavel, PR
Unioeste 37*	<i>Bombyx mori</i>	Arapongas, PR
Unioeste 38*	<i>B. mori</i>	Ibaiti, PR
Unioeste 39*	<i>Cosmopolites sordidus</i>	São Miguel do Iguaçu, PR
Unioeste 40*	Coleoptera: Curculionidae	Cascavel, PR
Unioeste 41*	<i>Astylus variegatus</i>	Cascavel, PR
Unioeste 42*	Coleoptera: Erotylidae	Cascavel, PR
Unioeste 43**	Hymenoptera: Formicidae	São Miguel do Iguaçu, PR
Unioeste 44*	Hemiptera: Pentatomidae	Toledo, PR
Unioeste 45*	<i>A. variegatus</i>	Marechal Cândido Rondon, PR
Esalq 643*	Solo	Lavras, MG

Beauveria bassiana**Metarhizium anisopliae*

Além destes, foi utilizado o isolado de *B. bassiana* Esalq 643, proveniente do Laboratório de Patologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP), selecionado por Moino Júnior et al. (1998) e testado posteriormente por Moino Júnior & Alves (1998), servindo como isolado padrão.

4.1 SELEÇÃO DOS CULTIVARES DE MILHO

Para a verificação de resistência ou suscetibilidade dos cultivares de milho, estes foram submetidos aos testes com chance de escolha, para determinar preferência e não-preferência a *Sitophilus* spp. e sem chance de escolha ou confinamento, para verificar a influência dos cultivares na biologia do inseto.

4.1.1 Teste com chance de escolha

Neste teste, foram utilizadas bacias translúcidas com 35cm de diâmetro por 15cm de altura. A 5cm do fundo das bacias foram montados suportes com isopor, onde se encaixaram 6 recipientes plásticos com 2,5cm de diâmetro por 2cm de altura, que foram dispostos radialmente, ficando todos com a abertura no mesmo nível que o suporte de isopor (Figura 2). Em seguida, cada recipiente recebeu 20g de sementes de cada um dos cultivares de milho, sendo esta quantidade suficiente para preencher totalmente os recipientes. Na seqüência, foram liberados 120 insetos, adultos e não sexados, no centro do suporte de isopor. Uma outra bacia

igual foi colocada sobre esta de forma contrária e com auxílio de fita crepe foram vedadas.

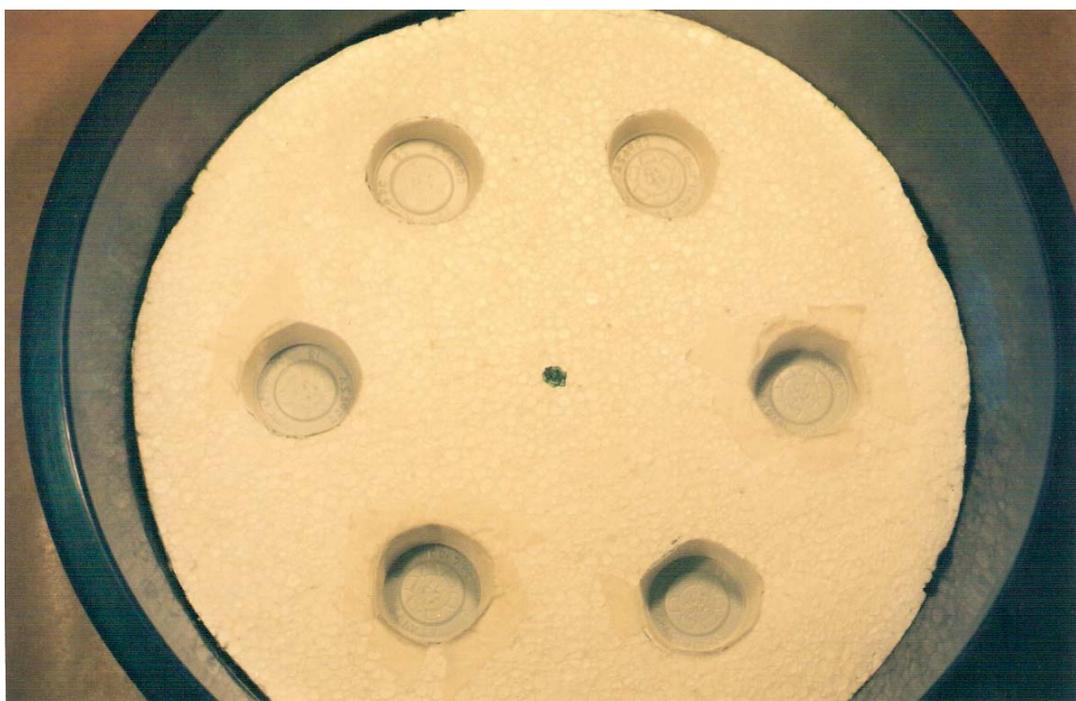


Figura 2. Bandeja com recipientes para disposição dos cultivares de milho para experimento com chance de escolha. O ponto central indica o local de liberação dos insetos.

As bacias foram deixadas em sala com fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 24 horas, foram realizadas contagens para verificar o número de insetos presentes em cada recipiente com os diferentes cultivares. Este procedimento foi realizado por 5 vezes, sendo considerado cada um como uma repetição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados analisados estatisticamente com a aplicação do teste F e as médias comparadas

pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar® (Ferreira, 2006), sendo os dados previamente transformados em arcseno $\sqrt{x/100}$, com auxílio do programa Microsoft Excel®. As transformações de todos os dados, quando necessárias, foram feitas segundo o teste de F máximo de Hartley.

4.1.2 Teste sem chance de escolha (confinamento)

O teste foi realizado com os cultivares que apresentaram, respectivamente, a maior e a menor preferência no teste anterior. Para cada cultivar foram realizadas 10 repetições, sendo que cada repetição foi disposta em um recipiente transparente de vidro com 6cm de diâmetro por 6cm de altura, fechado com um tecido fino. Para cada cultivar foram ainda preparadas 10 repetições com 20g de material não contendo insetos, sendo consideradas testemunhas.

Os recipientes foram mantidos durante sete dias, para que houvesse a infestação dos grãos, em sala com fotoperíodo de 12 horas, temperatura média de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e U.R. de 55%. Posteriormente, os insetos foram retirados, e após 15 dias foram iniciadas as observações diárias, para acompanhar a emergência dos adultos. Os insetos emergidos foram retirados, contados e deixados em outro recipiente por 24 horas nas mesmas condições, e pesados em seguida, sendo este procedimento repetido por 70 dias, tempo suficiente para todos os insetos emergirem.

Foram avaliados, o número de insetos emergidos, o peso dos insetos adultos, a duração do ciclo ovo-adulto, o número de grãos danificados e peso dos mesmos. Para verificar os danos causados às sementes, como perfuração e perda

de peso, os grãos danificados foram separados, contados e pesados. A perda de peso da matéria seca dos grãos foi determinada pela diferença entre o peso da matéria seca final da testemunha e o peso da matéria seca final dos tratamentos, segundo metodologia descrita por Toscano et al. (1999).

A média de duração do ciclo ovo-adulto foi calculada através da média ponderada com auxílio do programa Microsoft Excel®. Quando necessário, os dados foram transformados em arcseno $\sqrt{x/100}$, \sqrt{x} ou $\sqrt{x} + 1$, sendo posteriormente submetidos a análise estatística com a aplicação do teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar® e Microsoft Excel®.

4.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Foram realizados testes de avaliação de patogenicidade e comparação dos isolados, realizando os experimentos de concentração letal média, crescimento vegetativo, produção de conídios em placa, produção de conídios em arroz e produção de conídios em cadáver de *Sitophilus* spp.

4.2.1 Avaliação da Patogenicidade

As técnicas de laboratório utilizadas, bem como os meios de cultura produzidos são embasados nas metodologias descritas por Alves et al. (1998). Os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo M.E. (Meio de

Esporulação), durante 8 dias, incubados em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 14 horas de fotofase. Em seguida, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio e armazenados em frascos de vidro esterilizados, mantidos em freezer a -10°C , até a utilização nos bioensaios, por um tempo que não ultrapassou 15 dias.

As suspensões de conídios foram preparadas com água destilada contendo espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%), posteriormente foram quantificadas em câmara de Neubauer e padronizadas na concentração de $1,0\times 10^9$ conídios/mL, conforme concentração aproximada, utilizada nos experimentos de Moino Júnior et al. (1998).

Para a determinação da patogenicidade dos isolados, quinze adultos de *Sitophilus* spp. foram imersos em 1mL de suspensão de fungo sob agitação manual, durante 10 segundos.

Posteriormente, estes insetos foram retirados e acondicionados em placas-de-petri contendo papel filtro e arroz polido. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições, cada uma com quinze insetos. As placas foram mantidas no interior de potes plásticos com espuma umedecida e incubados em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas.

O experimento foi avaliado diariamente, como descrito nos experimentos realizados por Moino Júnior & Alves (1997), por um período de 10 dias, sendo os insetos mortos mergulhados em álcool 70% e em água destilada para a desinfecção superficial. Em seguida, foram acondicionados, individualmente, em placas de polietileno contendo papel filtro estéril e umedecido (câmara úmida) e estas foram colocadas no interior de um recipiente plástico com espuma umedecida ao fundo, para confirmação da mortalidade pelo patógeno. Os dados foram analisados graficamente pelo programa Microsoft Excel® e os isolados que

apresentaram mortalidade confirmada mínima de 80% foram selecionados para os testes da fase seguinte.

4.2.2 Comparação dos Isolados

Os isolados selecionados foram comparados quanto a sua virulência, concentração letal, crescimento vegetativo, produção de conídios em placa, produção de conídios em arroz e produção de conídios em cadáver.

4.2.2.1 Comparação da Virulência

Os isolados pré-selecionados foram novamente testados, e destes, os que apresentaram maior mortalidade acumulada ao 5^o dia foram selecionados para serem analisados quanto aos testes descritos.

Os dados foram analisados graficamente pelo programa Microsoft Excel® e os isolados que apresentaram maior mortalidade confirmada acumulada ao 5^o dia após inoculação foram selecionados para os testes seguintes.

4.2.2.2 Determinação da Concentração Letal (CL₅₀)

Os isolados foram multiplicados conforme metodologia já descrita, e foram preparadas suspensões de conídios nas concentrações de $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$,

$1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^9$ conídios/mL, utilizando-se o mesmo procedimento experimental adotado no experimento de avaliação de patogenicidade citado anteriormente. A mortalidade foi avaliada diariamente num período de 10 dias, padronizando para análise o 5º e o 10º dia, e posteriormente foi verificada a mortalidade confirmada conforme descrito anteriormente. Experimentos semelhantes, para verificar CL_{50} de isolados de fungos entomopatogênicos contra insetos-praga, foram conduzidos por Moino Jr. & Alves (1997), Neves & Hirose (2005) e Rohde et al. (2006).

Os dados foram transformados em arcseno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância (Teste F) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância, segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se os programas estatísticos Sisvar® e Microsoft Excel®.

4.2.2.3 Crescimento Vegetativo

Foram realizadas inoculações dos isolados selecionados em dois pontos na superfície do meio de cultura (M.E.) em placas de Petri, que foram incubadas em $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14 horas de fotofase, durante 8 dias. Após esse período, foram realizadas duas medições perpendiculares do diâmetro das colônias formadas, para obtenção do diâmetro médio. Para cada um dos isolados foram preparadas quatro placas, sendo cada colônia considerada uma repetição.

Os dados foram transformados em \sqrt{x} e submetidos à análise de variância (Teste F) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ambos a 5% de

significância, segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se o programa estatístico Sisvar®.

4.2.2.4 Produção de Conídios em placa-de-Petri

As colônias obtidas no experimento anterior foram recortadas do meio de cultura na linha terminal do halo da colônia e individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e armazenadas em freezer a -10°C. Para a avaliação, as colônias foram imersas em 10mL de solução de água destilada com espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%) e agitadas em vórtex por um minuto, e quando necessário os conídios foram removidos com o auxílio de um pincel, sendo a quantificação feita em câmara de Neubauer. Os dados foram transformados em \sqrt{x} e submetidos à análise descrita para o experimento de avaliação de crescimento vegetativo.

4.2.2.5 Produção de Conídios em Arroz

A produção de conídios em arroz seguiu a metodologia descrita por Leite et al. (2003). Inicialmente, produziu-se inóculo multiplicando-se os fungos em placas-de-petri contendo M.E a $26\pm 1^\circ\text{C}$ e 14 horas de fotofase, por 10 dias. Em seguida, coletaram-se os conídios, com os quais prepararam-se suspensões para inoculação em arroz a fim de se obter as matrizes.

A inoculação foi realizada em arroz pré-cozido, autoclavado e resfriado com 5mL da suspensão fúngica em cada frasco, sendo este procedimento realizado em

câmara de fluxo laminar. Os frascos foram fechados e incubados em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 14 horas de fotofase, até o crescimento e conidiogênese, que ocorreu, aproximadamente, no 10^o dia.

Após este período, sacos de polipropileno contendo 150g de arroz pré-cozido, autoclavado e resfriado, foram inoculados com, aproximadamente, 15g do substrato produzido nas matrizes. Os sacos foram fechados e incubados nas mesmas condições anteriores, durante sete dias. Para cada isolado foram preparados dez sacos com arroz, sendo cada um considerado uma repetição. Decorrido este tempo, os sacos foram abertos e seu conteúdo exposto a um fluxo de ar durante o período de 24 horas. Após este período, o arroz foi espalhado em bandejas de plástico e mantido em $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após três dias, o arroz foi recolhido das bandejas e foi realizada a avaliação da produção de conídios. Assim, três amostras de 1g do arroz foram tomadas de cada repetição e armazenadas a -10°C . Posteriormente foram suspensas em água destilada + espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%) e agitadas em vórtex para serem submetidas à contagem em câmara de Neubauer. O delineamento experimental e a análise estatística adotada foram os mesmos descritos no experimento de avaliação de crescimento vegetativo.

4.2.2.6 Produção de Conídios em Cadáver de Insetos Adultos

A multiplicação dos fungos, bem como a suspensão, inoculação e a incubação dos insetos foram realizadas conforme metodologia descrita no teste de

avaliação de patogenicidade, num total de sete repetições por isolado. Os insetos mortos foram submetidos à câmara úmida, conforme também descrito neste teste.

Sete insetos de cada uma das repetições foram selecionados, sendo que o critério de seleção foi a plena conidiogênese, conforme metodologia realizada por Neves & Hirose (2005) e Rohde et al. (2006), e acondicionados em frascos de fundo chato armazenados em freezer a -10°C até a realização da contagem, sendo cada tubo considerado uma repetição.

Para a avaliação, os conídios da superfície dos insetos foram removidos imergindo os mesmos em 10mL de água destilada com espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%). A suspensão foi agitada em vórtex durante um minuto e quantificada utilizando-se a câmara de Neubauer. A análise dos dados foi executada com base nos procedimentos descritos para o experimento de avaliação do crescimento vegetativo.

4.3 ASSOCIAÇÃO DAS VARIEDADES RESISTENTES E FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Após a seleção dos cultivares e dos isolados de fungos, foram realizados testes de estratégias de aplicação, sendo que estes isolados foram misturados no cultivar resistente e no suscetível, previa e posteriormente a infestação por *Sitophilus* spp. (Figura 3), seguindo metodologia descrita por Moino Júnior & Alves (1998).



Figura 3. Experimento de estratégia de aplicação (Inoculação pré e pós Infestação) e integração dos métodos.

4.3.1 Inoculação pré-infestação

Foram utilizados recipientes transparentes de vidro, com 6cm de diâmetro por 6cm de altura, fechados com um tecido fino. Os recipientes foram divididos em dois grupos, sendo que em 14 destes recipientes foram colocadas 20g do cultivar CD 3121 e nos outros 14 recipientes 20g do cultivar CD 307, selecionados na 2ª fase do experimento no teste de confinamento .

Em seguida, foi misturado em 7 recipientes de CD 3121 e 7 recipientes de CD 307, sendo cada recipiente considerado um repetição, o fungo *B. bassiana* (isolado Unioeste 4), na concentração de 0,27g/100g de grãos (aproximadamente

$2,0 \times 10^7$ conídios/100g de grãos). Assim sendo, cada recipiente recebeu 0,05g de fungo (aproximadamente $0,5 \times 10^7$ conídios) e o mesmo procedimento foi realizado com o fungo *B. bassiana* (isolado Esalq 643), na concentração de 0,2g, sendo que os conídios foram misturados com amido de milho para maior dispersão. Estes isolados foram selecionados na 1ª fase do experimento.

Posteriormente, foram colocados 20 adultos não sexados de *Sitophilus* spp. em cada recipiente, e estes foram armazenados em ambiente com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 12 horas e U.R. média de 55%. Oito dias após a infestação, os insetos foram retirados e os recipientes voltaram para o mesmo ambiente. Avaliações, transformação de dados e análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no teste sem chance de escolha ou de confinamento.

4.3.2 Inoculação pós-infestação

Este teste seguiu a metodologia descrita no teste de inoculação pré-infestação, para isto, insetos, recipientes, cultivares e isolados foram os mesmos descritos anteriormente e nos mesmos padrões de concentração e inoculação, assim como as condições de incubação. No entanto, para este teste, a aplicação do fungo nos recipientes foi realizada oito dias após a infestação, logo após a retirada dos insetos. Os métodos utilizados para as avaliações, transformações de dados e análises estatísticas foram os mesmos realizados para o experimento de testes sem chance de escolha.

Para os dois métodos de inoculação foi utilizada uma testemunha sem infestação e sem fungo, constando de apenas 7 frascos de cada cultivar, contendo 20g de grãos.

Os tratamentos da 3ª fase, bem como as estratégias de inoculação, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos realizados na 3ª fase, compondo as estratégias de aplicação e integração dos métodos, controle biológico e variedades resistentes, para controle de *Sitophilus* spp.

Infestação	Isolado	Cultivar
Testemunha	--	307
		3121
Pré-infestação	Unioeste 4	307
		3121
	Esalq 643	307
		3121
Pós-infestação	Unioeste 4	307
		3121
	Esalq 643	307
		3121

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DOS CULTIVARES DE MILHO

5.1.1 Teste com chance de escolha

Observou-se que os insetos foram atraídos por todos os cultivares analisados, no entanto ocorreram diferenças significativas no percentual de insetos atraídos por cada um dos cultivares (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem média (\pm EP) de atratividade de *Sitophilus* spp. para os diferentes cultivares de milho, em teste com chance de escolha, após 24 horas de exposição.

Variedades	Atratividade (%)**
CD 304	19,3 \pm 4,50 AB
CD 306	4,0 \pm 1,10 B
CD 307	40,7 \pm 7,38 A
CD 308	6,3 \pm 1,41 B
CD 3121	8,2 \pm 3,00 B
OC 705	15,0 \pm 3,47 AB
CV (%)	44,76

**Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\arcseno \sqrt{x/100}$.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

A existência de diferença significativa na atratividade, indica uma provável existência de resistência e corroboram as observações de Santos & Foster (1981b), Boiça Júnior et al. (1997), Toscano et al. (1999), Guzzo et al. (2002) e Santos et al. (2005), em experimentos com *Sitophilus* spp. testados contra diversos cultivares de milho.

O cultivar CD 307 foi o que apresentou, significativamente, maior atratividade a *Sitophilus* spp. (40,7%), enquanto os que apresentaram a menor atratividade foram os cultivares CD 306 (4% de atratividade), CD 308 (6,3%), e CD 3121 (8,2%). Assim, os menos atrativos nas condições analisadas, segundo Lara (1991), apresentam uma resistência do tipo não-preferência ou antixenose para alimentação.

Em experimentos realizados para verificar a atratividade de *S. zeamais* por diferentes cultivares de milho, Santos & Foster (1981b) observaram que o cultivar mais atrativo atraiu 19,6% do total de insetos, enquanto que no cultivar menos atrativo foram atraídos 0,7% dos insetos. Estes autores também destacam que os cultivares menos atrativos indicam a não-preferência do inseto.

Em testes semelhantes, Toscano et al. (1999) verificaram a atratividade de *S. zeamais* para 10 diferentes cultivares de milho, sendo que nos cultivares mais atrativos observaram 24,7% dos insetos, contra 3,1% nos menos atrativos. Segundo estes autores, os cultivares podem apresentar substâncias alimentares que interferem ou estimulam a alimentação dos insetos, assim, os materiais que atraem um menor número de insetos, possivelmente, apresentam um fator de repelência.

Nos experimentos realizados por Guzzo et al. (2002) observou-se que o cultivar de milho mais atrativo para *S. zeamais* apresentou 20,2% de insetos, e o menos atrativo apresentou 8,9%, destacando, para este, uma provável fonte de

resistência do tipo não-preferência para a oviposição ou alimentação. O cultivar CD 3121 também foi avaliado pelos autores citados, mas ao contrário dos resultados aqui obtidos, este cultivar apresentou uma grande atratividade a *S. zeamais*, representando 18,98% do total de insetos atraídos, estando entre os três cultivares mais preferidos. Isto pode ter ocorrido pelo fato dos cultivares aqui testados, em conjunto com o cultivar CD 3121, serem mais atrativos quando comparados aos cultivares testados no outro trabalho, anulando assim a atratividade do cultivar CD 3121.

Comparando-se os resultados aqui obtidos, nos cultivares mais atrativos, com os resultados obtidos nos trabalhos citados, verifica-se que, em geral, são menores. Contudo, Santos et al. (2005), obteve números mais expressivos de atratividade de *Sitophilus* spp., sendo que o cultivar de milho mais atrativo apresentou 50,9% dos insetos, enquanto o menos atrativo teve uma média de 19,6%, e atribuíram a não-preferência de *Sitophilus* spp. a substâncias na composição de determinados cultivares que possam causar a repelência destes, e conseqüente atração por outros.

Verifica-se que para a maioria dos autores citados, a atratividade ou repelência de insetos por determinados cultivares de milho, podem estar relacionadas com substâncias presentes ou liberadas pelos grãos, assim também destacado por Boiça Júnior et al. (1997), relacionando ao odor e ao sabor dos grãos a atratividade de *S. zeamais*.

Contudo, Tipping et al. (1987), em experimentos realizados com extratos de diferentes cultivares de milho visando relacionar a atração química e a resistência a *S. zeamais*, observaram que substâncias aleloquímicas não estão relacionadas com a não-preferência à alimentação. Tipping et al. (1988), por outro lado, descreveram

que a composição do pericarpo, bem como a dureza do grão, são fatores determinantes, como também observado em 'Tripsacorn' por Throne & Eubanks (2002), sendo que este material, quando o pericarpo estava intacto, não sofreu o ataque de gorgulhos.

Grãos mais duros, mais escuros e mais pesados, segundo Miranda et al. (1995), apresentam menor preferência a *S. zeamais*, contudo, estes mesmos autores destacam que estas características não são relevantes na explicação da preferência, uma vez que estas correlações não foram significativas em seus experimentos.

Considerando que os cultivares aqui analisados, que apresentaram não-preferência são do tipo semi-duro e alaranjado (CD 306 e CD 308) e semi-dentado e amarelo (CD 3121), enquanto o cultivar mais preferido é do tipo semi-dentado e amarelo (CD 307), conclui-se também que a dureza e a cor do grão não interferem na preferência alimentar do inseto, já que cultivares apresentando o mesmo tipo de dureza e cor estão classificados como o mais e o menos preferido para alimentação de *Sitophilus* spp. Desta forma, dureza e cor nem sempre podem ser associadas ao tipo de resistência não-preferência (Ramalho et al., 1976 e Gudrups et al., 2001).

Assim, pode-se observar que não há um consenso quanto ao que realmente interfere na preferência alimentar de *Sitophilus* spp. Mas, foi verificado que os cultivares altamente preferidos atraem uma grande proporção de insetos, conseqüentemente, restam poucos para infestar os demais cultivares, ou seja, estes podem ter escapado a infestação, podendo assim, não ter um fator de repelência em potencial (Santos & Foster, 1981).

Para complemento deste teste, foi realizado o teste sem chance de escolha ou de confinamento, e para isto foi selecionado o cultivar mais preferido, CD 307, e

dentre os que apresentaram não-preferência à alimentação, foi selecionado o CD 3121.

5.1.2 Teste sem chance de escolha (confinamento)

Neste teste, procurou-se observar se os cultivares analisados apresentavam algum efeito na biologia de *Sitophilus* spp. e constatou-se que houve diferença significativa entre os dois cultivares, quanto à duração do ciclo, número de adultos emergidos, peso dos adultos e perda total de peso dos grãos.

Verificou-se que o cultivar que apresentou não-preferência para a alimentação no primeiro teste, CD 3121, também foi o mesmo onde os insetos tiveram maior duração no ciclo ovo-adulto, com média de 52,5 dias, o que representa menor número de gerações, sendo portanto considerado um cultivar resistente. Já no cultivar CD 307, que demonstrou maior preferência para alimentação, os insetos apresentaram menor duração no ciclo, 47,5 dias, representando um cultivar suscetível quando comparado ao CD 3121 (Tabela 5).

Tabela 5. Duração média do ciclo biológico, número e peso de adultos de *Sitophilus* spp. emergidos das variedades de milho, em teste sem chance de escolha.

Variedades	Duração do ciclo (dias)	Número de adultos emergidos*	Peso dos adultos (mg)*
CD 307	47,5 ± 0,72B	37,7 ± 5,43A	2,4 ± 0,02B
CD 3121	52,5 ± 0,91A	14,0 ± 1,26B	2,5 ± 0,05A
CV (%)	2,33	26,66	1,66

*Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} . Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Nos experimentos de confinamento, com grãos debulhados, Ramalho et al. (1977) observaram duração média do ciclo variando entre 44,8 a 53,9 dias, considerando, que os cultivares nos quais a duração média foi menor, são suscetíveis, pois favorecem o desenvolvimento de *S. zeamais*, tal como aqui apresentados.

Da mesma forma, Bortoli (1987) obteve para o cultivar considerado suscetível, média de 44,4 dias e, o cultivar resistente 48,4 dias de duração média do ciclo de desenvolvimento (ovo-adulto).

Contudo, Boiça Júnior et al. (1997) obtiveram uma variação semelhante quanto ao ciclo biológico de *S. zeamais* em grãos de diferentes cultivares de milho, variando de 41,2 a 51,4 dias, sem no entanto, haver diferença significativa na duração do ciclo do inseto pelos cultivares, corroborando os experimentos realizados por Toscano et al. (1999) e Guzzo et al. (2002).

Nos cultivares suscetíveis, avaliados por Marsaro Júnior et al. (2005a), o ciclo biológico de *S. zeamais* foi menor que 41 dias, enquanto nos resistentes foi

superior a 44 dias, ou seja, a variação se deu no intervalo de 38,87 a 46,62 dias. Contudo, testando outros cultivares de milho, verificaram que a variação do ciclo biológico de *S. zeamais* foi de 51,5 a 58,4 dias (Marsaro Júnior et al., 2005b).

Ressalta-se que Guzzo et al. (2002) obtiveram, para *S. zeamais* provenientes do cultivar CD 3121, média do ciclo ovo-adulto de 49,85 dias, porém, Marsaro Júnior et al. (2005b) observou para este mesmo cultivar uma média do ciclo do inseto de 55,6 dias. Considerando que no presente trabalho a média foi de 52,5 dias, intermediária em relação aos demais, essas variações podem ser explicadas por diferenças nas condições em que o experimento foi mantido, sendo a temperatura um fator que pode acelerar ou retardar o desenvolvimento dos insetos. Neste sentido, sabe-se que o limite de variação de temperatura para *S. oryzae* é de 15° a 34,1°C, acima ou abaixo desse intervalo o inseto não se reproduz (Guedes, 1990/1991), sendo que o ciclo ovo-adulto de *S. zeamais* em milho, a 28°C e 60% U.R., é em média 34 dias (Pacheco & Paula, 1995).

Além do ciclo biológico, o número de insetos emergidos também é um fator a se considerar, pois segundo Guzzo et al. (2002), um dos mais importantes indicadores de antibiose é a morte larval, que pode ser expressa pelo baixo número de insetos emergidos, sendo que para os cultivares resistentes, os autores obtiveram 12 a 15 insetos, e nos mais suscetíveis a média alcançou 49 indivíduos.

Os cultivares aqui analisados apresentaram diferenças significativas quanto ao número de insetos emergidos, sendo que o cultivar CD 307 apresentou média de 37,7 insetos emergidos, enquanto que para o cultivar CD 3121 obteve-se média de 14 insetos.

De forma contrastante, no cultivar CD 3121, Guzzo et al. (2002) verificaram emergência média de 49 insetos, contudo dados semelhantes aos aqui obtidos

foram registrados por Marsaro Júnior et al. (2005b), segundo os quais, o número de insetos emergidos no cultivar CD 3121 esteve entre os menores.

Segundo Ramalho et al. (1977), existe uma relação entre duração do ciclo e o número de adultos emergidos, determinando assim que quanto mais suscetível é o milho, maior é o número de insetos emergidos e menor é o tempo que demoram a emergir, como observado por Guzzo et al. (2002) para o cultivar CD 3121, e aqui observado para o cultivar CD 307.

Santos & Foster (1981b) observaram que a maioria dos cultivares que se mostraram como mais resistentes para a emergência e postura dos ovos, nos testes de confinamento, também foram os menos preferidos no teste de livre escolha. Ressalta-se assim, que a “não-preferencia” e “antibiose” são mecanismos de resistência do grão de milho ao gorgulho, e que os dois testes se completam neste quesito, pois os mais suscetíveis também se apresentaram como os mais preferidos.

Ao contrário destes, Boiça Júnior et al. (1997) observaram que o cultivar com uma das maiores emergências foi o menos preferido no teste de livre escolha. Associaram este fato a alguma causa química, como a liberação pelos grãos de substâncias atrativas aos gorgulhos para oviposição e/ou alimentação. Mesmo atraindo poucos insetos no teste de livre escolha, mas apresentando uma grande emergência, são classificados como suscetíveis.

Quanto ao peso dos adultos emergidos, apesar da diferença ser de apenas 0,1 mg, foi estatisticamente significativa, sendo que os adultos que emergiram do cultivar CD 3121 apresentaram peso de 2,5mg enquanto os insetos emergidos do cultivar CD 307 apresentaram um peso médio de 2,4mg. Isso pode ser explicado pela menor competição dos insetos no cultivar CD 3121, ocasionando insetos com peso maior, ou mesmo pela maior disponibilidade de nutrientes, fazendo com que se

alimentassem menos, tendo, mesmo assim, ganho de peso, por este cultivar possuir uma quantidade suficiente de nutrientes.

Toscano et al. (1999) obtiveram diferença quanto ao peso dos adultos emergidos em função dos milhos, onde o peso variou de 2,15mg a 2,79mg, atribuindo esta diferença a algum fator de antibiose e/ou não-preferência para a alimentação. O peso de adultos de *Sitophilus* spp. não diferiu entre os cultivares analisados por diversos autores, como Vowotor et al. (1995), Guzzo et al. (2002), Marsaro Júnior et al. (2005a e 005b).

Nos testes realizados por Marsaro Júnior et al. (2005b) conclui-se que os híbridos analisados possuíam requerimentos de aminoácidos básicos para o desenvolvimento de *S. zeamais*, explicando a igualdade no peso dos adultos nos diferentes híbridos. No entanto, todos estes autores, com exceção de Guzzo et al. (2002), observaram que o desenvolvimento dos insetos foi afetado em relação aos cultivares.

Em relação aos danos provocados por *Sitophilus* spp. nos cultivares analisados, verificou-se que houve uma diferença significativa quanto à perda total de peso dos grãos e porcentagem de perda total do peso dos grãos, não ocorrendo diferença significativa quanto à porcentagem de grãos danificados (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem média de grãos danificados, porcentagem média de perda total de peso dos grãos de milho e perda média total (g), causados por *Sitophilus* spp., em teste sem chance de escolha.

Variedades	Grãos danificados (%) [*]	Perda total (g) ^{1**}	Perda total (%) ^{1*}
CD 307	44,8 ± 4,59A	0,9 ± 0,12A	4,5 ± 0,61A
CD 3121	40,3 ± 1,86A	0,3 ± 0,09B	1,7 ± 0,44B
CV (%)	17,82	11,38	36,88

¹ Valores comparados às respectivas testemunhas.

^{*}Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\arcseno \sqrt{x/100}$.

^{**}Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x} + 1$.

Médias (± EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Apesar de não haver diferença quanto à porcentagem de grãos danificados entre os cultivares (Figura 4 e 5), ocorreu diferença em relação à perda de peso total. Este fato pode estar relacionado à presença de substâncias atrativas presentes no cultivar CD 307, fazendo com que os insetos se alimentem mais desse cultivar. Também pode estar relacionado à menor disponibilidade de nutrientes, de forma que os insetos se alimentem mais, a fim de suprir suas necessidades.



Figura 4. Cultivar CD 307, à esquerda grãos saudios e à direita grãos danificados por *Sitophilus* spp.



Figura 5. Cultivar CD 3121, à esquerda grãos saudios e à direita grãos danificados por *Sitophilus* spp.

A perda total do peso dos grãos foi significativamente diferente, sendo que o cultivar CD 307 apresentou uma maior perda 0,9g (4,5%) enquanto o cultivar CD 3121 apresentou 0,3g (1,7%). Podendo também estar relacionado ao maior número de insetos emergidos, e pela própria preferência alimentar apresentada no teste com chance de escolha. Segundo Kim & Kossou (2003), existe uma relação entre o número de insetos emergidos e o nível de dano provocado.

Conforme Matioli (1981), a perda de peso dos grãos atacados é um fator muito importante, pois além do aspecto econômico, também indica um fator de resistência. Como também observado por Faleiro et al. (1995), onde o cultivar considerado resistente foi o que apresentou menor perda de peso, sendo apenas 0,1%.

Boiça Júnior et al. (1997) verificaram a variação do peso dos grãos consumidos por *S. zeamais* de 0,1 a 0,6g, sugerindo que os cultivares que apresentaram uma redução de 0,1g são menos adequados ao consumo alimentar deste inseto.

Toscano et al. (1999) observaram que a perda média de peso dos grãos infestados com *S. zeamais* variou de um cultivar para outro, onde relatou a variação de 0,04g a 0,70g, indicando uma possível substância alimentar ou um fator que interferiu ou estimulou a alimentação destes.

De forma contrastante, Guzzo et al. (2002) verificaram que o cultivar CD 3121 foi o mais suscetível ao ataque de *S. zeamais*, pois apresentou maior porcentagem e maior valor de peso de grãos danificados, foi um dos mais atrativos, apresentando maior número de insetos emergidos e maior perda total.

Marsaro Júnior et al. (2005b) verificaram que a perda de peso variou de 2,4 a 8,6g, para 100g de grãos, sendo que o cultivar CD 3121 apresentou, tal como aqui

observado, a menor perda. Estes relataram que cultivares com maior teor de unidades inibidoras de amilase retardam o desenvolvimento das larvas, sofrendo menores perdas e aumentando a resistência desses. Ainda segundo estes autores, o cultivar CD 3121 apresentou um dos índices mais elevados de unidades inibidoras de amilase, provocando uma menor alimentação dos insetos e conseqüente, menores perdas nos grãos. Sendo este cultivar classificado pelos autores citados, como um dos cultivares mais resistentes, apresentando menores perdas de peso de matéria seca dos grãos, e conseqüentemente, menores números de insetos. Foi considerado resistente, uma vez que afetou negativamente o comportamento de oviposição e/ou desenvolvimento das larvas.

Com estes resultados, verifica-se que o cultivar CD 3121, quando comparado ao cultivar CD 307, é resistente ao ataque de *Sitophilus* spp., pois apresenta uma maior duração do ciclo, número menor de insetos emergidos e menor perda total, podendo ser consideradas resistências do tipo não-preferência e antibiose.

Segundo Lara (1991) e Gallo et al. (2002), antibiose é quando o inseto se alimenta normalmente do cultivar e esse interfere negativamente na sua biologia, como ocorreu com o cultivar CD 3121, quanto à duração do ciclo. Já a resistência do tipo não-preferência (antixenose) provoca uma resposta negativa no inseto durante o processo de seleção, que deixa de utilizá-lo para alimentação, oviposição ou abrigo, em relação aos outros cultivares, como também verificado para este cultivar nos testes realizados.

Gudrups et al. (2001) verificaram que o tamanho dos grãos é determinante na resistência dos cultivares ao ataque de *S. zeamais*, sendo que os grãos grandes apresentaram maior resistência que os menores. Isto também foi verificado no

presente experimento, sendo que os grãos do cultivar CD 3121 são maiores em relação aos do cultivar CD 307.

Assim sendo a resistência é relativa, devendo sempre ser comparada com outros cultivares, pois pode ser resistente a uma praga e suscetível a outras. Em relação aos insetos, a constatação de resistência pode ser verificada por diferenças no comportamento, biologia, duração do ciclo, peso, dentre outros fatores, sendo os testes aqui realizados, considerados parâmetros para esta verificação. Estes são realizados, pois muitas vezes um cultivar menos preferido, em condições de livre escolha, torna-se suscetível e apresenta danos elevados quando o inseto não tem outro cultivar alternativo. A verificação em plantas pode ser feita pela intensidade do dano ocasionado, perda de peso e outros fatores (Lara, 1991 e Gallo et al., 2002).

5.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

5.2.1 Avaliação da Patogenicidade

Verificou-se que todos os isolados analisados apresentaram ação patogênica a *Sitophilus* spp., sendo que o isolado Esalq 643 (98,3%) foi o que apresentou maior mortalidade confirmada, seguido pelo Unioeste 4 (95%), ambos da espécie *B. bassiana* (Tabela 7, Figura 6).

Tabela 7. Porcentagem média de mortalidade confirmada de adultos de *Sitophilus* spp. por diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* após 10 dias de incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Isolados	Mortalidade (%)
<i>Beauveria bassiana</i>	
Unioeste 1	45,0
Unioeste 3	8,3
Unioeste 4	95,0
Unioeste 5	71,7
Unioeste 25	28,3
Unioeste 26	71,7
Unioeste 36	80,0
Unioeste 37	78,3
Unioeste 38	35,0
Unioeste 39	83,3
Unioeste 40	70,0
Unioeste 41	86,7
Unioeste 42	43,3
Unioeste 44	91,7
Unioeste 45	90,0
Esalq 643	98,3
<i>Metarhizium anisopliae</i>	
Unioeste 22	65,0
Unioeste 43	33,3

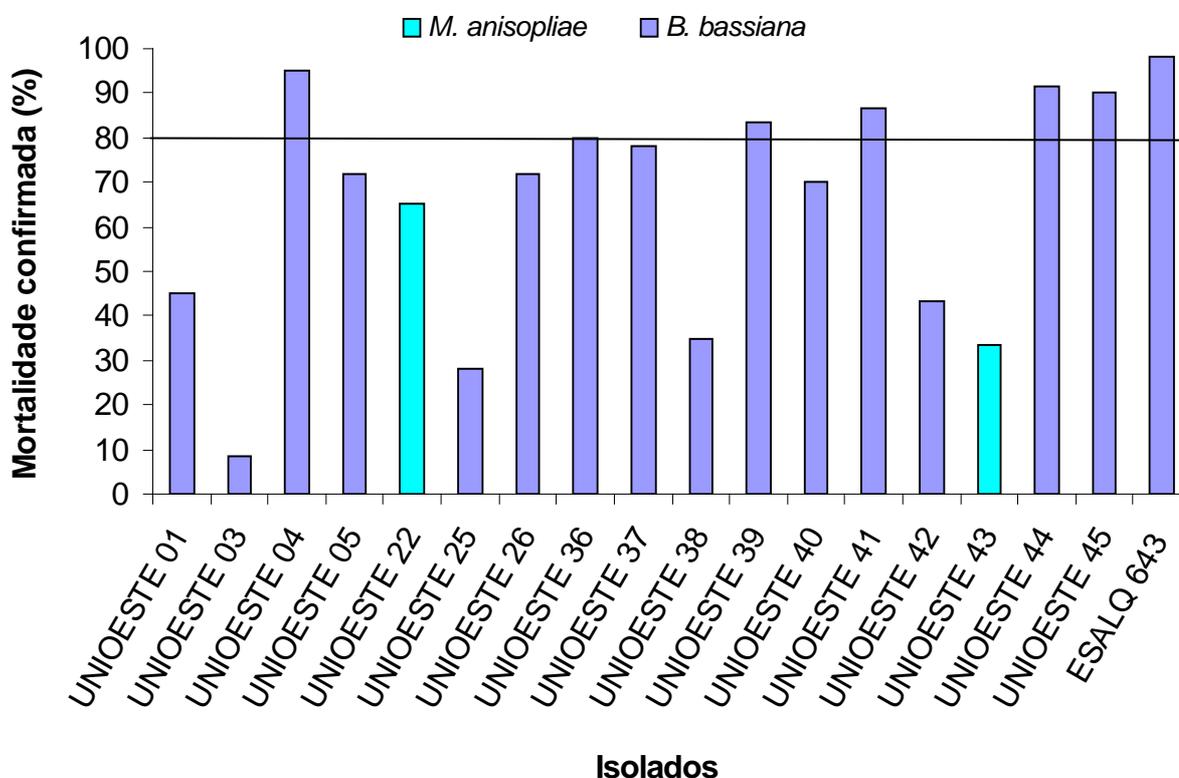


Figura 6. Eficiência de diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na mortalidade confirmada de adultos de *Sitophilus* spp. ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Moino Júnior et al. (1998) obtiveram resultados semelhantes, verificando que isolados de *B. bassiana* causaram a maior porcentagem média de mortalidade para *S. zeamais* (56,7 a 100%) e para *S. oryzae* (33,3 a 100%). Ressaltaram que o isolado Esalq 643 foi o segundo melhor, dentre 72 isolados analisados, apresentando mortalidade média de 86,7% para *S. zeamais* e 96,7% para *S. oryzae*.

Ainda que em número reduzido (apenas 2), o fungo *M. anisopliae*, aparentemente, apresenta menor eficiência contra *Sitophilus* spp. Neste sentido, dados semelhantes foram igualmente observados por Moino Júnior et al. (1998) que constataram que o fungo *B. bassiana* é melhor adaptado para infectar *S. zeamais* e

S. oryzae quando comparado a *M. anisopliae*, pois os isolados de *M. anisopliae* não causaram mais que 60% de mortalidade neste inseto, e em contrapartida, mais da metade dos isolados de *B. bassiana* causaram mais de 60% de mortalidade.

Assim, dentre os isolados avaliados, Unioeste 4, Unioeste 36, Unioeste 39, Unioeste 41, Unioeste 44, Unioeste 45 e Esalq 643, foram os selecionados pois causaram mortalidade confirmada em *Sitophilus* spp. mínima de 80%, sendo todos isolados do fungo *B. bassiana*.

5.2.2 Comparação dos Isolados

5.2.2.1 Comparação da Virulência

Dos isolados que selecionados anteriormente, foi realizada uma nova comparação, selecionando-se os três isolados que apresentaram maior mortalidade confirmada acumulada ao 5^o dia após a inoculação, sendo eles os isolados Unioeste 4 (78,3%), Unioeste 39 (71,7%) e Esalq 643 (63,3%) (Figura 7 e 8).

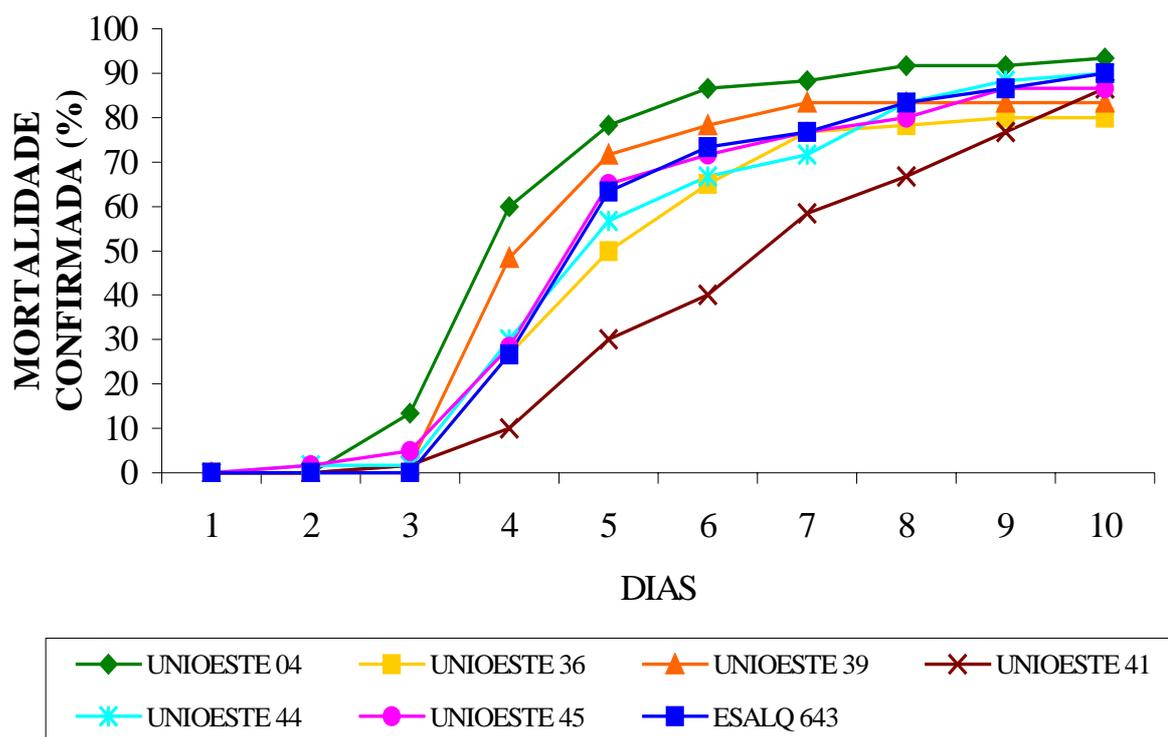


Figura 7. Mortalidade confirmada acumulada de adultos de *Sitophilus* spp. por isolados de *B. bassiana* ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

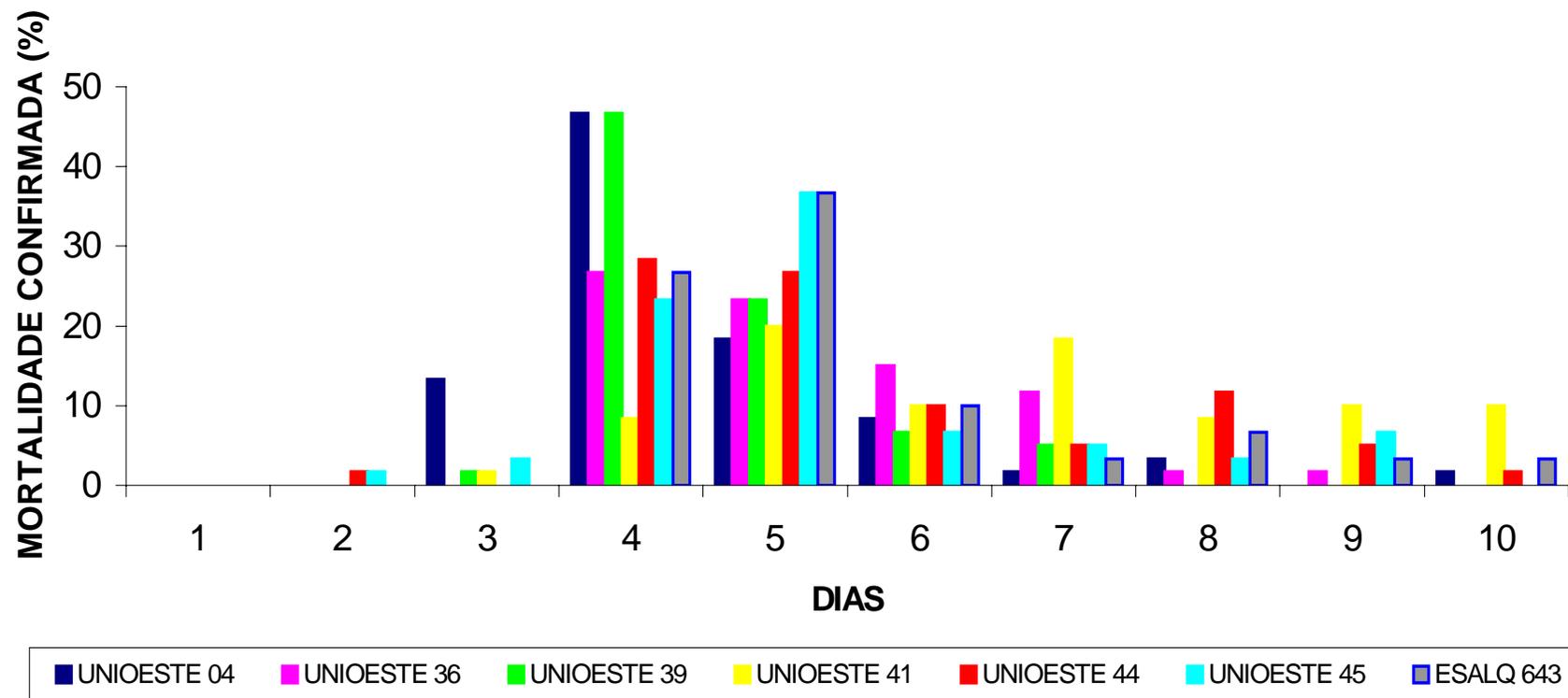


Figura 8. Porcentagem de mortalidade confirmada diária de adultos de *Sitophilus* spp. por isolados de *B. bassiana* ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Segundo Neves & Hirose (2005), a escolha da mortalidade confirmada como parâmetro de seleção, baseia-se no fato de que os fungos diferem dos agroquímicos quanto ao modo de ação, comprovando desta forma a mortalidade do inseto pelo entomopatógeno.

Dentre os isolados selecionados, dois foram obtidos a partir de insetos da ordem Coleoptera, Unioeste 4 e Unioeste 39, sendo o último coletado de um inseto da família Curculionidae, já o isolado Esalq 643 foi coletado de solo. Segundo Xu (1988), citado por De La Rosa et al. (1997), geralmente os isolados de *B. bassiana* apresentam um alto nível de virulência para o hospedeiro ao qual ele foi isolado ou para espécies próximas, dentro da mesma ordem, tal como foi observado por Rohde et al. (2006), que verificaram que dentre os isolados mais efetivos no controle de *A. diaperinus*, encontraram-se aqueles obtidos a partir de cadáveres do próprio inseto.

No entanto, ressalta-se que isto não é uma regra, podendo ser mais agressivo a insetos filogeneticamente distintos do hospedeiro original, como observado para o isolado Esalq 643, neste experimento. Badilla & Alves (1991) relatam que a virulência é uma característica própria da linhagem utilizada, sendo necessária técnicas especiais para se determinar a sua virulência.

5.2.2.2 Determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀)

Os dados obtidos neste experimento não se adequaram ao modelo de Probit, optando-se assim, pela comparação de médias de mortalidade por meio da análise de variância e teste de Tukey. Alguns isolados selecionados por Neves & Hirose (2005) para controle de *H. hampei* também não se adequaram na análise de

Probit, e os isolados que se ajustaram ao modelo não demonstraram diferenças significativas entre as CL_{50} . Assim, estes autores optaram por uma análise de variância com teste de comparação de médias das mortalidades em cada concentração, com regressão polinomial para determinar a equação de concentração/resposta dos diferentes isolados e calcular as CL_{50} .

Assim, também Rohde et al. (2006) nos experimentos de seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para controle de *A. diaperinus*, obtiveram dados que não se ajustaram no modelo de Probit, e para isso optaram pela comparação de médias no 5^o e no 10^o dia após inoculação, complementando o estudo comparativo com análise de outros parâmetros biológicos.

Segundo Haddad (1998), a análise de DL, CL e TL_{50} com a utilização do Probit, em testes envolvendo entomopatógenos, nem sempre é possível, pois os bioensaios não são do tipo estímulo-resposta, por isso muitas vezes os dados não se enquadram ao modelo.

Neste experimento, verificou-se que todos os isolados apresentaram diferença significativa na mortalidade confirmada conforme a variação da concentração de conídios, sendo que com o aumento da concentração ocorreu aumento na mortalidade (Tabela 8).

Tabela 8: Porcentagem média de mortalidade confirmada (\pm EP) de adultos *Sitophilus* spp. submetidos a diferentes concentrações de conídios de *B. bassiana* ao 5^o e ao 10^o dia após inoculação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Concentrações de conídios/mL	Isolados					
	Unioeste 4		Unioeste 39		Esalq 643	
	5 ^o	10 ^o	5 ^o	10 ^o	5 ^o	10 ^o
1×10^4	1,7 \pm 0,42Ba	5,0 \pm 0,42Ca ^{n.s.}	1,7 \pm 0,48Ca	6,7 \pm 0,42Ca ^{n.s.}	3,3 \pm 0,48Ba	5,0 \pm 0,42Ca ^{n.s.}
1×10^5	1,7 \pm 0,42Ba	3,3 \pm 0,48Ca ^{n.s.}	1,7 \pm 0,42Ca	5,0 \pm 0,80Ca ^{n.s.}	5,0 \pm 0,80Ba	10,0 \pm 0,48Ca ^{n.s.}
1×10^6	5,0 \pm 0,80Ba	11,7 \pm 1,85Ca ^{n.s.}	5,0 \pm 0,80BCa	10,0 \pm 1,98Ca ^{n.s.}	5,0 \pm 1,25Ba	5,0 \pm 1,25Ca ^{n.s.}
1×10^7	3,3 \pm 0,48Ba	10,0 \pm 0,48Ca ^{n.s.}	3,3 \pm 0,48Ca	11,7 \pm 1,05Ca ^{n.s.}	3,3 \pm 0,48Ba	16,7 \pm 0,48BCa*
1×10^8	18,3 \pm 1,85Aa	48,3 \pm 2,67Ba ^{n.s.}	21,7 \pm 1,42Ba	45,0 \pm 1,58Ba ^{n.s.}	18,3 \pm 1,25Ba	45,0 \pm 0,42ABa*
1×10^9	61,7 \pm 1,25Aa	95,1 \pm 0,78Aa ^{n.s.}	76,7 \pm 2,21Aa	91,7 \pm 1,58Aa ^{n.s.}	50,0 \pm 3,54Aa	78,3 \pm 2,29Aa ^{n.s.}
CV (%)	41,21					

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\arcseno \sqrt{x/100}$.

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

MINÚSCULA na linha nos dias correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

* Médias com diferença para o mesmo isolado entre os dois dias de avaliação, pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, na linha, não diferem entre si

A mortalidade ao 5^o dia apresentada pelo Unioeste 4 variou de 1,7% nas menores concentrações a 61,7% na concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL, sendo que esta concentração não diferiu significativamente da concentração de $1,0 \times 10^8$. No 10^o dia a variação esteve entre 3,3% ($1,0 \times 10^5$) e 95,1% ($1,0 \times 10^9$), sendo que esta última se destacou entre as demais.

O isolado Unioeste 39 apresentou uma variação na mortalidade ao 5^o dia de 1,7% ($1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^5$) a 76,7% ($1,0 \times 10^9$), sendo esta última concentração superior às demais estatisticamente. A variação na mortalidade apresentada no 10^o dia variou entre 5,0% ($1,0 \times 10^5$) e 91,7% ($1,0 \times 10^9$), havendo diferença significativa apenas na última concentração.

O isolado Esalq 643 apresentou 3,3% de mortalidade na concentração de $1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^7$ ao 5^o dia, e da mesma forma que o anterior, as concentrações diferiram significativamente apenas da concentração de $1,0 \times 10^9$, com 50,0% de mortalidade. Ao 10^o dia a mortalidade esteve entre 5,0% ($1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^6$) e 78,3% ($1,0 \times 10^9$) sendo esta concentração diferente estatisticamente das demais.

Verificou-se que *Sitophilus* spp. apresentou baixa mortalidade quando inoculado com isolados de *B. bassiana* nas concentrações $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Pode-se observar desta forma, que concentrações inferiores a $1,0 \times 10^8$, para os isolados aqui testados, não são recomendadas para ensaios de seleção de fungos para este inseto (Figura 9).

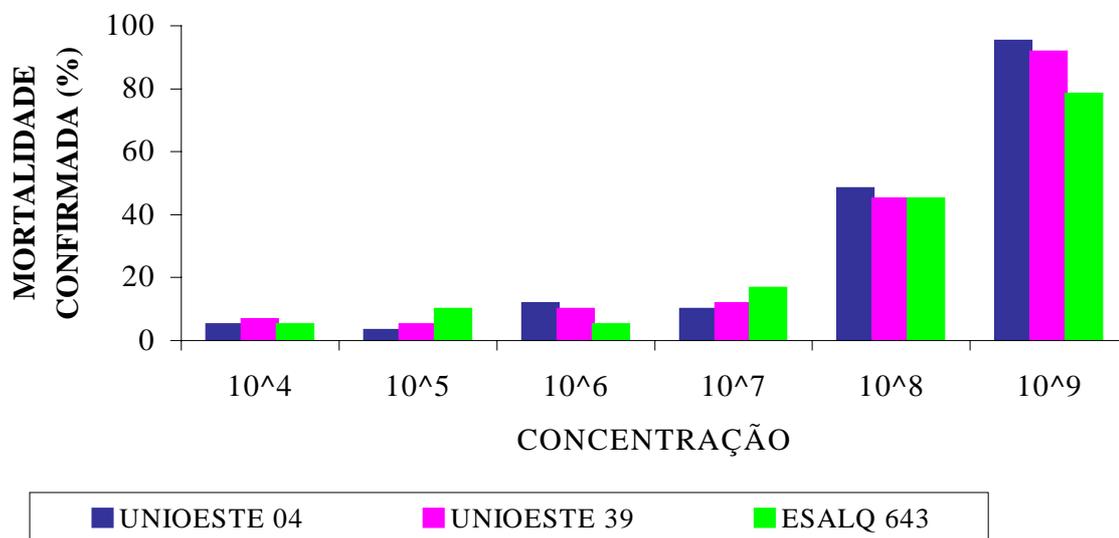


Figura 9: Porcentagem média de mortalidade de *Sitophilus* spp., submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*, após 10 dias de incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Apesar do Unioeste 39 apresentar mortalidade média de 76,7% ao 5^o dia, sendo a maior mortalidade verificada, não diferiu significativamente do Unioeste 4 (61,7%) e do Esalq 643 (50,0%). Pode-se observar também, que dentro do mesmo dia e da mesma concentração, a mortalidade não diferiu significativamente entre os isolados testados, portanto, todos apresentam potencial para utilização em programas de controle biológico de *Sitophilus* spp.

Avaliando a CL_{50} de dois isolados de *B. bassiana* para controle de *S. zeamais* e *S. oryzae*, Moino Júnior & Alves (1997) utilizaram inoculações em pó, nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0g de conídios/100g de grãos de arroz. Os autores verificaram que para *S. oryzae* não houve diferença entre os

isolados dentro da mesma concentração, sendo que a CL₅₀ para este inseto foi de 0,1g de conídios/100g de grãos. Contudo, na avaliação da CL₅₀ dos isolados para controle de *S. zeamais*, estes diferiram entre si, sendo que o isolado 604 apresentou menor CL₅₀ (0,01g de conídios/100g) comparado ao isolado 476 (0,05g de conídios/100g de grãos). Porém, são dados de difícil comparação, pois não apresentam a concentração de conídios/mL ou conídios/g.

No entanto, Kassa et al. (2002), avaliando a CL₅₀ de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para controle de *S. zeamais*, utilizaram inoculações líquidas, verificando que o isolado de *M. anisopliae* apresentou a menor CL₅₀ ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) em relação aos isolados de *B. bassiana* ($2,0 \times 10^6$ conídios/mL), demonstrando, ao contrário dos resultados aqui obtidos, maior potencialidade. Entretanto, também verificaram diferenças entre a CL₅₀ apresentada por dois dos isolados de *B. bassiana* testados.

Assim como os autores citados, Neves & Hirose (2005) obtiveram diferenças na mortalidade de *H. hampei*, entre os isolados testados, dentro da mesma concentração. Assim também foi observado por Rohde et al. (2006) com *A. diaperinus*, que além deste fator, observaram a variação da mortalidade entre os diferentes isolados, considerando o mesmo dia de avaliação.

Comparando-se a mortalidade de *Sitophilus* spp. ao 5º e ao 10º dia após a inoculação, dentro de cada concentração, para cada isolado, apenas Esalq 643 mostrou diferença significativa entre os dois dias para as concentrações de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL (3,3% para o 5º dia e 16,7% para o 10º dia) e $1,0 \times 10^8$ (18,3% para o 5º dia e 45,0% para o 10º dia), os demais isolados e as demais concentrações não diferiram significativamente entre si.

5.2.2.3 Crescimento Vegetativo

Em relação ao crescimento vegetativo o isolado Esalq 643 apresentou o maior diâmetro médio de colônia, 4,5cm, quando comparado ao Unioeste 4, com 3,4cm e ao Unioeste 39 com 3,3cm (Figura 10, Tabela 9).

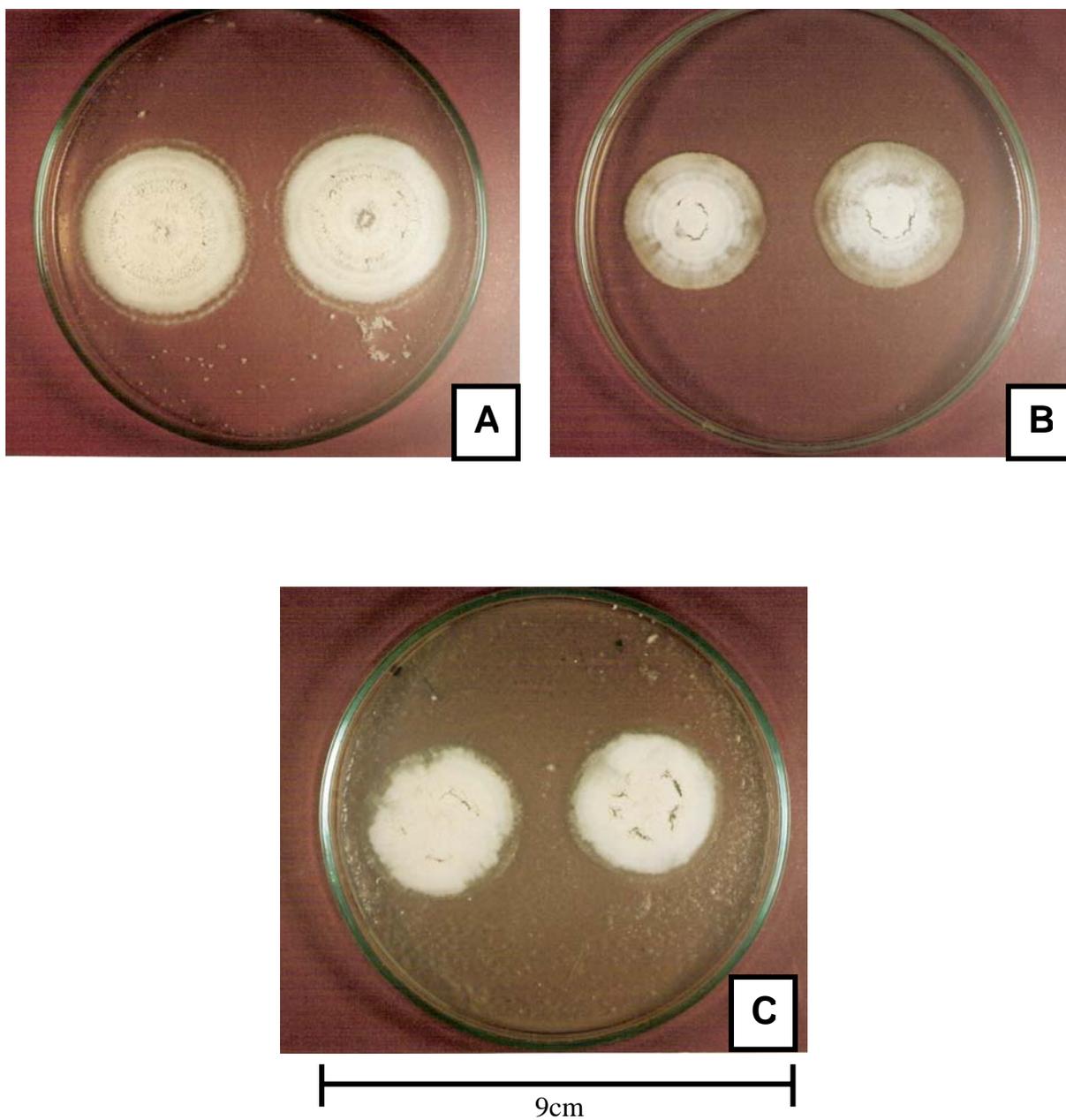


Figura 10. Colônia de *B. bassiana*, A) isolado Unioeste 4, B) isolado Esalq 643 e C) isolado Unioeste 39, cultivado em M.E, 8 dias após a incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Tabela 9. Diâmetro médio e produção média de conídios em colônias (\pm EP) de diferentes isolados de *B. bassiana* em meio de cultura, após 8 dias de incubação ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Isolados	Diâmetro médio das colônias (cm)	Produção média de conídios/colônia*	Produção média de conídios/cm ^{2**}
Unioeste 4	3,4 \pm 0,08B	1,6 \pm 0,25B	1,6 \pm 0,21A
Unioeste 39	3,3 \pm 0,11B	1,3 \pm 0,25B	1,7 \pm 0,33A
Esalq 643	4,5 \pm 0,03A	4,8 \pm 0,74A	3,0 \pm 0,46A
CV (%)	2,32	16,51	22,29

*número médio de conídios por colônia $\times 10^8$

**número médio de conídios por cm² $\times 10^7$

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Valores discrepantes aos aqui apresentados foram verificados por Diodato & Santos (1992/1993) que obtiveram diâmetro médio micelial de 1,3 a 1,83cm para o fungo *B. bassiana*, extraído da vespa-da-madeira, *Sirex noctilio*.

Batista Filho et al. (2001) obtiveram 4,3 cm de diâmetro médio de colônia após 14 dias de incubação, sendo este resultado semelhante ao aqui apresentado para o isolado Esalq 643. O diâmetro de colônia de *B. bassiana* obtido por Hirose et al. (2001) foi de 3,1cm após 8 dias de incubação, sendo semelhante ao obtido no presente trabalho para o isolado Unioeste 39. Para o fungo *B. bassiana* extraído de *H. hampei*, após 6 dias de incubação, Depieri et al. (2005) verificaram variação no diâmetro de colônia de 2,09 a 3,25cm.

Ao contrário dos valores aqui obtidos, Alexandre et al. (2006) verificaram média de 1,35cm no diâmetro das colônias de isolados de *B. bassiana* após 10 dias de incubação a 26°C , sendo valores inferiores aos do presente trabalho.

No entanto, valores semelhantes aos aqui apresentados, foram verificados por Rohde et al. (2006), sendo que o isolado que apresentou maior diâmetro de colônia mediu 4,3cm, após 10 dias de incubação. Estes autores também testaram o isolado Unioeste 4, que apresentou diâmetro médio de colônia de 3,8cm, sendo apenas 0,4cm maior do diâmetro aqui obtido.

Pode-se verificar que, em geral, não há grandes variações em relação ao diâmetro médio das colônias dentro da mesma espécie de fungo e em relação ao mesmo isolado. As pequenas variações podem ser ocasionadas pelo fotoperíodo, temperatura e umidade relativa, que normalmente são padronizadas, além das variações no tempo de incubação, no tipo e na espessura do meio de cultura utilizado e no tempo de armazenamento do isolado. Também leva-se em conta a quantidade de conídios presentes na alça de inoculação no ato da repicagem e a genética dos isolados, que pode diferir dentro da mesma espécie e também dentro do mesmo isolado.

5.2.2.4 Produção de conídios em placa-de-Petri

Com relação à produção média de conídios por colônia, o isolado Esalq 643 diferiu significativamente dos demais, apresentando concentração média de $4,8 \times 10^8$ conídios/colônia, contra $1,6 \times 10^8$ conídios/colônia do isolado Unioeste 4 e $1,3 \times 10^8$ conídios/colônia do isolado Unioeste 39. No entanto, em relação à produção média de conídios/cm², este isolado não diferiu dos demais (Tabela 09, Figura 11).

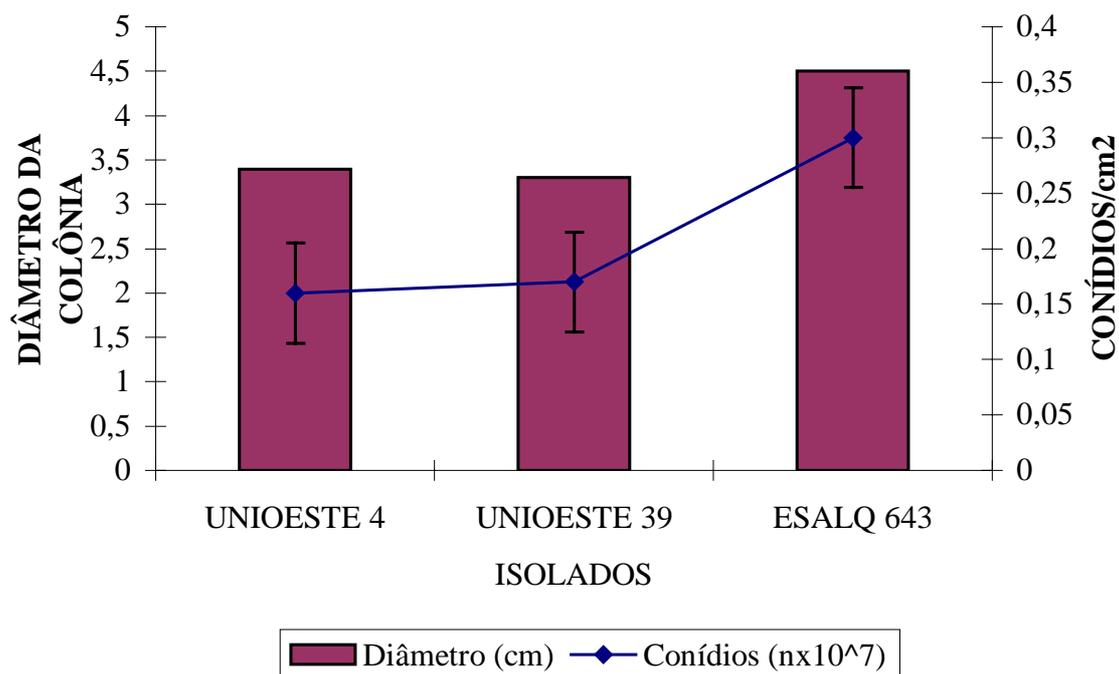


Figura 11. Crescimento vegetativo e produção de conídios em meio de cultura de isolados de fungos entomopatogênicos ($26 \pm 1^\circ C$, 14 horas de fotofase).

Valores superiores aos obtidos neste trabalho foram apresentados por Batista Filho et al. (2001), que obtiveram produção de $9,8 \times 10^8$ conídios/colônia para *B. bassiana* e por Rohde et al. (2006) com variação de $3,8 \times 10^8$ a $4,0 \times 10^9$ conídios/colônia. Sendo que este último dado é referente ao isolado Unioeste 4, que no presente trabalho apresentou a média de $1,6 \times 10^8$, o que representa uma produção 20 vezes menor. Como citado anteriormente, são vários os fatores que podem afetar a produção, no entanto, observações posteriores demonstraram a diminuição gradativa na produção e esporulação deste isolado (dados não publicados).

No entanto, Alexandre et al. (2006) obtiveram valores de produção de conídios/colônia inferiores aos aqui apresentados, sendo que seus dados estiveram

no intervalo $0,2 \times 10^8$ a $0,7 \times 10^8$ conídios/colônia. Essa diferença pode estar relacionada com o menor diâmetro de colônia verificado por estes autores.

Em relação à produção de conídios/cm², Liu et al. (2003) obtiveram dados contrários aos aqui apresentados, onde observaram diferenças significativas na produção de conídios/cm² entre os diferentes isolados de *B. bassiana* com variação de $1,6 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^7$ conídios/cm² a 20°C, em meio Ágar Dextrose Sabouraud. O valor superior obtido por este autor é semelhante aos valores aqui obtidos com os isolados Unioeste 4 ($1,6 \times 10^7$) e Unioeste 39 ($1,7 \times 10^7$).

O isolado Unioeste 4, no trabalho realizado por Rohde et al (2006), apresentou produção de $3,2 \times 10^8$ conídios/cm², representando 11 vezes a produção obtida neste experimento.

Verificou-se que ocorreu uma relação positiva entre o diâmetro médio das colônias e a produção média de conídios/colônia, sendo o isolado Esalq 643 superior em relação aos demais. No entanto, relacionando estes valores com a produção média de conídios/cm², observou-se que não há relação, desta forma, pode-se concluir que o isolado que apresenta maior diâmetro de colônia nem sempre irá apresentar uma maior produção de conídios.

No entanto, Rohde et al. (2006) não verificaram relação entre diâmetro de colônia e produção média de conídios/colônia, como verificado no presente trabalho. Porém, comparando-se o diâmetro de colônia com a produção média de conídios/cm², os dados aqui apresentados corroboram os dados apresentados por estes autores, verificando que não há relação entre diâmetro de colônia e produção de conídios.

5.2.2.5 Produção de conídios em arroz

O isolado Esalq 643 apresentou $10,4 \times 10^7$ conídios/g de arroz e o isolado Unioeste 4 apresentou $7,8 \times 10^7$ conídios/g de arroz, sendo estes isolados significativamente superiores ao isolado Unioeste 39 ($4,3 \times 10^7$ conídios/g) (Tabela 10). Comparando-se a produção dos isolados Esalq 643 e Unioeste 4 com produção de conídios de *B. bassiana* em arroz, Leite et al. (2003) obtiveram $6,0 \times 10^9$ conídios/g de arroz. Da mesma forma, Alves & Pereira (1998) citam que a produção de *B. bassiana* em arroz pode alcançar 10^{10} a 10^{11} conídios/g.

Tabela 10. Número médio de conídios em arroz e em cadáveres (\pm EP) de *Sitophilus* spp. ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase)

Isolados	Produção média de conídios/arroz/g*	Produção média de conídios/cadáver**
Unioeste 4	$7,8 \pm 0,69^a$	$1,5 \pm 0,12B$
Unioeste 39	$4,3 \pm 0,24B$	$1,6 \pm 0,20B$
Esalq 643	$10,4 \pm 1,15^a$	$2,6 \pm 0,27A$
CV (%)	15,25	8,49

* número médio de conídios por grama de arroz $\times 10^7$

**número médio de conídios por cadáver $\times 10^7$

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Rohde et al. (2006) verificaram que a produção do isolado Unioeste 4 foi maior em relação aos demais isolados, apresentando uma média de $8,3 \times 10^8$ conídios/g de arroz. Apesar do isolado Unioeste 4 obter uma das maiores produções

no presente trabalho, o valor resultante corresponde a uma produção cerca de 10 vezes menor do que a obtida por Rohde et al. (2006).

Esta diferença pode estar relacionada a fatores que envolvem o método de produção empregado, como o tempo de pré-cozimento do arroz, teor de umidade, tempo e condições de incubação, bem como a quantidade de substrato dentro de cada recipiente e a quantidade de inóculo aplicado. Além desses fatores, a qualidade do arroz utilizado no experimento e a qualidade do inóculo empregado, são essenciais para a boa produção.

5.2.2.6 Produção de conídios em cadáver de insetos adultos

Todos os isolados apresentaram conidiogênese sobre os cadáveres de *Sitophilus* spp. (Figura 12), no entanto, o isolado Esalq 643 mostrou novamente superioridade em relação aos demais, apresentando produção média de $2,6 \times 10^7$ conídios/cadáver (Tabela 10).

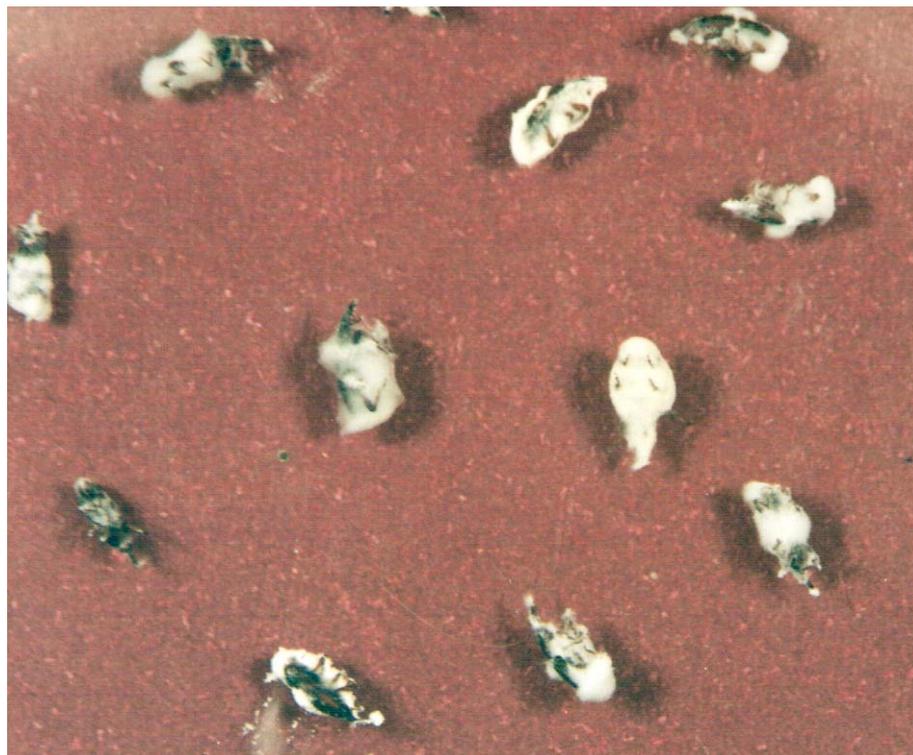


Figura 12. Conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de *Sitophilus* spp., após 10 dias da inoculação ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Avaliando a conidiogênese sobre cadáveres adultos de *Rhodnius prolixus* (Hemíptera: Reduviidae), Luz & Fargues (1998) observaram variações na esporulação média em 5 e 10 dias de incubação.

No caso de adultos de *Triatoma infestans*, inoculados com *B. bassiana*, Luz et al. (1999) observaram que houve variação na produção de conídios entre os diferentes isolados testados, como também observado no presente trabalho. Neves & Hirose (2005) também obtiveram variações na produção média de conídios/cadáver em *H. hampei*, para os diferentes isolados de *B. bassiana* analisados.

Da mesma forma, Rohde et al. (2006) e Alexandre et al. (2006) observaram variações na produção de conídios/cadáver para *A. diaperinus*, em relação aos diferentes isolados testados. Alexandre et al. (2006) verificaram que a produção de

conídios/cadáver de *A. diaperinus* também está relacionada à temperatura do ambiente em que estes se encontram. Desta forma, observa-se que a conidiogênese está condicionada, principalmente, à temperatura em que os insetos estão mantidos e ao isolado empregado.

Baseando-se nos dados apresentados pelo teste de seleção de isolados, verificou-se que o isolado Esalq 643 destacou-se na maioria das análises, comprovando sua eficácia, assim como observado por Moino Júnior et al. (1998), sendo selecionado para a etapa seguinte. No entanto, o isolado Unioeste 4 também se mostrou eficaz, principalmente quanto à porcentagem de mortalidade, além de apresentar boa produção de conídios/g de arroz, também sendo selecionado para as análises da fase seguinte.

5.3 ASSOCIAÇÃO DAS VARIEDADES RESISTENTES E FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Verificou-se que houve diferença significativa entre os cultivares CD 3121 e CD 307 quanto à duração do ciclo de *Sitophilus* spp. quando tratados com o isolado Esalq 643 pré-infestação, sendo que com o cultivar CD 3121 obteve-se média de 66,7 dias, enquanto no cultivar CD 307 a média foi de 50,5 dias. Quando este isolado foi inoculado após a infestação, também verificou-se diferença significativa entre o cultivar CD 3121 (61,8 dias) e o cultivar CD 307 (50,1 dias).

Para o isolado Unioeste 4 também ocorreram diferenças, no entanto, apenas para o tratamento após a infestação, sendo que no cultivar CD 3121 a média foi de 62,2 dias e no cultivar CD 307 50,2 dias (Tabela 11).

Tabela 11. Duração média do ciclo biológico (\pm EP) de *Sitophilus* spp. emergidos nos cultivares CD 3121 e CD 307 tratados pré e pós-infestação dos insetos, com conídios de *B. bassiana* (isolados Unioeste 4 e Esalq 643).

	CD 3121		CD 307	
	Pré-infestação	Pós-infestação	Pré-infestação	Pós-infestação
Unioeste 4	55,3 \pm 3,77Ba	62,2 \pm 1,58Aa*	50,5 \pm 0,75Aa	50,2 \pm 0,35Ab ^{n.s.}
Esalq 643	66,7 \pm 4,18Aa	61,8 \pm 0,50Aa ^{n.s.}	50,5 \pm 1,56Ab	50,1 \pm 1,42Ab ^{n.s.}

CV (%) = 3,89

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Médias seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias seguidas pela mesma letra MINÚSCULA na linha nos tratamentos correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

* Médias com diferença significativa dentro do mesmo isolado e na mesma linha, pelo teste de Tukey (P<0,05).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Esta diferença no ciclo biológico do inseto também foi verificada no teste de confinamento (item 5.1.2), contudo as médias foram inferiores às apresentadas neste experimento, sendo para o cultivar CD 3121 a média de 52,5 dias, enquanto para o cultivar CD 307 foi 47,5 dias.

Em relação à duração do ciclo, o cultivar CD 3121, inoculado com Unioeste 4 pré-infestação, não apresentou diferença significativa com o cultivar CD 307. Para o cultivar CD 307, as inoculações pré e pós-infestação de ambos isolados não diferiram estatisticamente, no entanto, para o cultivar CD 3121 houve diferença significativa na estratégia de inoculação, mas apenas para o isolado Unioeste 4, que aplicado previamente à infestação, apresentou média de ciclo do inseto de 55,3 dias e aplicado pós-infestação apresentou média de 62,2 dias.

Dados semelhantes foram obtidos por Moino Júnior & Alves (1998) para *S. zeamais*, verificando redução no ciclo ovo-adulto quando os isolados foram aplicados pré-infestação (41 dias para o isolado Esalq 643 e 39,6 dias para o isolado Esalq 604), atribuíram este fato a uma possível seleção, onde os adultos que sobreviveram eram mais vigorosos e deram origem a indivíduos também mais vigorosos, conseqüentemente, tendo menor ciclo.

Contudo, Batta (2004) verificou um aumento no ciclo de desenvolvimento de *S. oryzae* quando a infestação ocorreu em grãos de trigo tratados previamente com a associação de formulações de *M. anisopliae* em carvão vegetal e em cinzas, como observado no presente trabalho para inoculação do isolado Esalq 643 pré-infestação no cultivar CD 3121.

Os isolados também apresentaram diferenças significativas entre si no parâmetro duração do ciclo, porém, apenas quando inoculados pré-infestação e no

cultivar CD 3121, sendo que o isolado Unioeste 4 apresentou duração média de 55,3 dias e o isolado Esalq 643, 66,7 dias.

Em relação ao número de insetos emergidos, não houve diferença significativa na integração entre os cultivares, isolados e estratégias de aplicação (Tabela 12). No entanto, em todos os resultados o número de insetos emergidos foi baixo, não ultrapassando a média de 8 insetos por tratamento, quando comparado ao experimento de teste sem chance de escolha (item 5.1.2), que apresentou o menor valor médio para o cultivar CD 3121 (14 insetos).

Tabela 12. Número de adultos de *Sitophilus* spp. emergidos (\pm EP) nos cultivares CD 3121 e CD 307 tratados pré e pós-inestação dos insetos, com conídios de *B. bassiana* (isolados Unioeste 4 e Esalq 643).

	CD 3121		CD 307	
	Pré-infestação	Pós-infestação	Pré-infestação	Pós-infestação
Unioeste 4	3,3 \pm 1,66Aa	7,7 \pm 3,63Aa ^{n.s.}	3,6 \pm 1,04Aa	3,4 \pm 1,00Aa ^{n.s.}
Esalq 643	1,6 \pm 0,57Aa	5,0 \pm 1,38Aa ^{n.s.}	2,6 \pm 1,31Aa	3,3 \pm 1,46Aa ^{n.s.}
CV (%) = 43,04				

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x}+1$.

Médias seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias seguidas pela mesma letra MINÚSCULA na linha nos tratamentos correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, no cultivar, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Moino Júnior & Alves (1998) observaram que o número de insetos emergidos, após 60 dias, nos tratamentos pré-infestação, foi menor do que os emergidos nos tratamentos após a infestação, sendo que o isolado Esalq 643, testado por estes autores, apresentou média de 3,93 insetos quando aplicado previamente, e 8,07 quando aplicado posteriormente. Estas médias são semelhantes às obtidas com o isolado Unioeste 4, sendo que o isolado Esalq 643 aplicado pré-infestação apresentou média de 1,6 insetos, e aplicado pós-infestação apresentou média de 5 insetos.

Em experimentos misturando conídios de *B. bassiana* com variedades de arroz, Rice & Cogburn (1999) verificaram que houve uma redução de 98% na emergência da progênie de *S. oryzae*, quando a associação ocorreu com a variedade de arroz selvagem e 83% de redução na progênie quando a associação ocorreu com arroz marrom.

Avaliando o peso médio dos adultos emergidos de *Sitophilus* spp., verificou-se diferença significativa entre os cultivares, quando inoculados com o isolado Unioeste 4 pré-infestação (Tabela 13). Assim, os adultos apresentaram maior peso médio no cultivar CD 3121 (2,8mg), que também foi o que apresentou maior ciclo de desenvolvimento, confirmando assim a teoria de Moino Júnior & Alves (1998), sobre a seleção de insetos mais vigorosos. Podendo também ser ressaltada a maior disponibilidade de nutrientes essenciais para o inseto neste cultivar, pois segundo Parra (1991), os diferentes alimentos interferem no crescimento, desenvolvimento e reprodução nos insetos. Assim, a quantidade e qualidade do alimento consumido, na fase larval, afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, peso do corpo, sobrevivência, fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição dos adultos.

Tabela 13. Peso médio (\pm EP) de *Sitophilus* spp. emergidos nos cultivares CD 3121 e CD 307 tratados pré e pós-inestação dos insetos, com conídios de *B. bassiana* (isolados Unioeste 4 e Esalq 643).

	CD 3121		CD 307	
	Pré-infestação	Pós-infestação	Pré-infestação	Pós-infestação
Unioeste 4	2,8 \pm 0,11Aa	2,6 \pm 0,07Aa ^{n.s.}	2,4 \pm 0,05Ab	2,4 \pm 0,10Aa ^{n.s.}
Esalq 643	2,4 \pm 0,04Ba	2,7 \pm 0,06Aa*	2,4 \pm 0,23Aa	2,5 \pm 0,09Aa ^{n.s.}

CV (%) = 4,36

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Médias seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias seguidas pela mesma letra MINÚSCULA na linha nos tratamentos correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

* Médias com diferença significativa dentro do mesmo isolado e na mesma linha, pelo teste de Tukey (P<0,05).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05)

Observou-se também, diferença significativa entre as estratégias de inoculação do isolado Esalq 643 no cultivar CD 3121. Neste caso, quando a inoculação foi pré-infestação os insetos apresentaram um menor peso, podendo ser atribuído à presença deste inóculo na superfície do grão, que entrando em contato com o inseto, poderia provocar uma disfunção no seu metabolismo, diminuindo desta forma, a absorção de nutrientes necessários pelo organismo, acarretando num menor peso.

Analisando a porcentagem média de grãos de milho danificados, observou-se que não houve diferença significativa quanto aos isolados utilizados e as estratégias de aplicação adotadas. Porém, houve diferença significativa quanto ao cultivar avaliado, sendo que o cultivar CD 3121, apresentou a menor porcentagem de grãos de milho danificados por *Sitophilus* spp., para as inoculações pré e pós-infestação, em relação ao cultivar CD 307. Para a inoculação pós-infestação a diferença ocorreu apenas em relação ao isolado Esalq 643 (Tabela 14).

Tabela 14. Porcentagem média (\pm EP) de grãos de milho danificados por *Sitophilus* spp. nos cultivares CD 3121 e CD 307 tratados pré e pós-infestação dos insetos, com conídios de *B. bassiana* (isolados Unioeste 4 e Esalq 643).

	CD 3121		CD 307	
	Pré-infestação	Pós-infestação	Pré-infestação	Pós-infestação
Unioeste 4	12,3 \pm 1,11Ab	16,2 \pm 1,57Aa ^{n.s.}	24,9 \pm 1,93Aa	23,4 \pm 3,18Aa ^{n.s.}
Esalq 643	7,6 \pm 0,90Ab	12,7 \pm 1,55Ab ^{n.s.}	29,1 \pm 5,18Aa	25,1 \pm 3,23Aa ^{n.s.}

CV (%) = 19,26

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em arcseno $\sqrt{x/100}$.

Médias seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias seguidas pela mesma letra MINÚSCULA na linha nos tratamentos correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

A diferença entre os cultivares em relação à porcentagem de grãos danificados por *Sitophilus* spp. não havia sido observada no teste de confinamento, onde ambos materiais apresentaram, estatisticamente, igualdade na porcentagem. A diferença aqui apresentada, pode estar relacionada com a repelência provável do fungo, que fez com que não ocorressem muitos testes de prova pelos insetos, danificando uma menor porcentagem de grãos, enquanto no tratamento pós-infestação, o inóculo pode ter interferido no desenvolvimento e metabolismo do inseto. Além disso, associaram-se dois fatores, o cultivar considerado resistente e menos preferível para alimentação e o inóculo, sendo que as interferências provocadas por ambos na biologia e desenvolvimento do inseto, foram verificadas no presente trabalho.

Da mesma forma, Figueira et al. (2003) associando o predador *C. externa* com genótipos de sorgo resistentes ao pulgão *S. graminum*, verificaram redução de 67,7% nos danos ocasionados pelo inseto em relação aos genótipos suscetíveis.

Assim também Batta (2004) verificou redução nos danos provocados por *S. oryzae* em grãos de trigo, quando estes foram tratados previamente com a associação de formulações de *M. anisopliae* em carvão vegetal e em cinzas.

Em relação à perda de peso dos grãos de milho (em gramas ou porcentagem) não houve variação entre os isolados testados e estratégias utilizadas, sendo que ambos foram inferiores ao que se obteve no teste de confinamento para ambos os cultivares (Tabela 15 e 16). Ressalta-se que houve diferença significativa em relação a perda de peso em gramas, entre o cultivar CD 3121 e CD 307, quando inoculados após a infestação com o isolado Unioeste 4. O cultivar CD 3121 apresentou 0,08g de perda quando comparado a testemunha (Tabela 15). Apesar deste tratamento não apresentar diferença significativa em

relação à porcentagem de grãos danificados, apresentou menor perda de peso, como também ocorreu no teste de confinamento, visto que este cultivar é tido como resistente a *Sitophilus* spp.

Tabela 15. Perda de peso¹ (\pm EP) dos grãos de milho provocado por *Sitophilus* spp. nos cultivares CD 3121 e CD 307 tratados pré e pós-infestação dos insetos, com conídios de *B. bassiana* (isolados Unioeste 4 e Esalq 643).

	CD 3121		CD 307	
	Pré-infestação	Pós-infestação	Pré-infestação	Pós-infestação
Unioeste 4	0,10 \pm 0,04Aa	0,08 \pm 0,02Ab ^{n.s.}	0,31 \pm 0,14Aa	0,37 \pm 0,20Aa ^{n.s.}
Esalq 643	0,03 \pm 0,02Aa	0,11 \pm 0,03Aa ^{n.s.}	0,17 \pm 0,05Aa	0,21 \pm 0,03Aa ^{n.s.}
CV (%) = 8,89				

¹ Valores comparados às respectivas testemunhas.

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x}+1$.

Médias seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias seguidas pela mesma letra MINÚSCULA na linha nos tratamentos correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 16. Porcentagem média de perda de peso¹ (\pm EP) dos grãos de milho provocado por *Sitophilus* spp. nos cultivares CD 3121 e CD 307 tratados pré e pós-infestação dos insetos, com conídios de *B. bassiana* (isolados Unioeste 4 e Esalq 643).

	CD 3121		CD 307	
	Pré-infestação	Pós-infestação	Pré-infestação	Pós-infestação
Unioeste 4	0,51 \pm 0,17Aa	0,39 \pm 0,10Aa ^{n.s.}	1,56 \pm 0,67Aa	1,82 \pm 1,00Aa ^{n.s.}
Esalq 643	0,13 \pm 0,08Aa	0,55 \pm 0,17Aa ^{n.s.}	0,86 \pm 0,27Aa	0,96 \pm 0,14Aa ^{n.s.}
CV (%) = 69,42				

¹ Valores comparados às respectivas testemunhas.

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em arcoseno $\sqrt{x/100}$.

Médias seguidas pela mesma letra MAIÚSCULA na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias seguidas pela mesma letra MINÚSCULA na linha nos tratamentos correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

^{n.s.} Dentro do mesmo isolado, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Avaliando a perda de peso provocada por *S. oryzae* em grãos de trigo tratados (25g da formulação fungo-arroz/500g de grãos de trigo) e não tratados com *B. bassiana*, Padín et al. (2002) observaram diferenças significativas, sendo que os grãos tratados apresentaram 7,1% de perda de peso e os não tratados 38,3%, demonstrando a suscetibilidade de *S. oryzae* a *B. bassiana*

Observou-se que com a integração dos métodos de controle houve, de forma geral, um aumento na duração do ciclo ovo-adulto, redução no número de insetos emergidos, diminuição na porcentagem de grãos danificados e diminuição na perda de peso. Verificou-se também que o cultivar CD 3121, que foi considerado resistente no teste de confinamento, mas não havia diferido quanto à porcentagem de grãos danificados, com a inoculação do entomopatógeno demonstrou diferença significativa em relação ao cultivar CD 307.

Verificou-se com estes experimentos que a associação dos métodos indica um potencial de utilização, recomendando-se a realização de testes para confirmar a eficiência dos tratamentos e também a realização em maior escala, sendo também indicada a associação com outros métodos de controle, como pós inertes.

Ainda que os dados sugiram um provável efeito do fungo sobre os insetos no tratamento pós-infestação, atingindo-os no interior dos grãos, existe uma dificuldade em explicar tal fato. Além disso, foi verificado um baixo número de insetos emergidos em todos os tratamentos, restringindo o número de repetições e interferindo na análise estatística.

Novos estudos de associação de métodos são necessários, integrando cultivares resistentes com Terra de Diatomáceas, Cinzas e outros pós inertes que venham a controlar este inseto.

6 CONCLUSÕES

Os cultivares de milho tratados diferem entre si quanto à preferência alimentar e resistência a *Sitophilus* spp., sendo que o cultivar CD 3121 foi considerado resistente e o cultivar CD 307 foi considerado suscetível.

Os isolados de *Beauveria bassiana* Unioeste 4, Unioeste 39 e Esalq 643 foram os isolados que provocaram maior mortalidade confirmada para *Sitophilus* spp., sendo que Esalq 643 se destacou na comparação dos isolados.

A associação entre os isolados e os cultivares indica eficiência no controle de *Sitophilus* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. Colheita, recebimento, limpeza, secagem e armazenamento de milho. Abimilho (Associação Brasileira das Industrias Moageiras de Milho): **Boletim Técnico**. Apucarana. 2002, 22p.

AKBAR, W.; LORD, J.C.; NECHOLS, J.R.; HOWARD, R.W. Diatomaceous Earth Increases the Efficacy of *Beauveria bassiana* Against *Tribolium castanaeum* Larvae and Increases Conidia Attachment. **Journal of Economic Entomology**. v.97, n.2, p.273-280, apr., 2004.

ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Efeito da temperatura e Cama do Aviário na Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o Controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**. v.35, n.1, p. 75-82, jan./feb., 2006.

ALVES, S.B. Patologia e Controle Microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.1, p.21-37, 1998a.

ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.11, p.289-381, 1998b.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.5, p.97-169, 1998.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de Laboratório. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.20, p.637-711, 1998.

ANDRADE JÚNIOR, A.S.; SANTOS, A.A.; SOBRINHOS, C.A.; BASTOS, E.H.; MELO, F.B.; VIANA, F.M.P.; FREIRE FILHO, F.R.; CARNEIRO, J.S.; ROCHA, M.M.; CARDOSO, M.J.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. **Pragas de grãos armazenados**. Embrapa Meio-Norte, Sistemas de Produção 2. Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em www.embrapa.br .

ARTHUR, K.H.; THRONE, J.E. Efficacy of Diatomaceous Earth to Control Internal Infestations of Rice Weevil and Maize Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**. v.96, n.2, p.510-518, apr., 2003.

ATHANASSIOU, C.G.; KAVALLIERATOS, N.G.; ANDRIS, N.S. Insecticidal Effect of Three Diatomaceous Earth Formulations Against Adults of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium caonfusum* (Coleoptera: Tenebrionidae)

on Oat, Rye and Triticale. **Journal of Economic Entomology**. v.97, n.6, p.2160-2167, dec., 2004.

ATHANASSIOU, C.G.; KAVALLIERATOS, N.G.; ECONOMOU, L.P.; DIMIZAS, C.B.; VAYIAS, B.J.; TOMANOVIC, S.; MILUTINOVIC, M. Persistence and Efficacy of Three Diatomaceous Earth Formulations Against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) on Wheat and Barley. **Journal of Economic Entomology**. v.98, n.4, p.1404-1412, aug., 2005.

AZEVEDO, J.L. Controle Microbiano de Insetos Praga e seu Melhoramento Genético. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. cap.2, p.69-96, 1998.

BADILLA, F.F.; ALVES, S.B. Controle do Gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria* spp. em condições de laboratório e em campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.20, n.2, 1991.

BATISTA FILHO, A.B.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**. v.30, n.3, p. 437-447, 2001.

BATTA, Y.A. Control os rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. **Crop Protection**. v.23, p.103-108, 2004.

BIANCO, R. **Pragas e seu controle**. In: IAPAR. A cultura do milho no Paraná. Londrina, out., 1991. 271p.

BOIÇA JÚNIOR, A.L.; LARA, F.M.; GUIDI, F.P. Resistência de Genótipos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). In: SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 26, n.3, p. 481-485, dez., 1997.

BORTOLI, S.A. Avaliação Preliminar sobre o Comportamento de alguns Genótipos de Milho em Relação ao ataque de *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência Agrônômica**. Jaboticabal, v.2, n.1, p.5-6, 1987.

BOTTON, M.; LORINI, I.; AFONSO, A.P.S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) Danificando a Cultura da Videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**. v. 34, n.2, p. 355-356, mar./abr., 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento (**CONAB**). Levantamento de Área Plantada, nov., 2005. Disponível em www.conab.gov.br. Acessado em 17.01.2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (**EMBRAPA**). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em www.cnpms.embrapa.br. Acessado em 27.12.2005.

CANEPPELE, M.A.B.; CANEPPELE, C.; LÁZZARI, F.A.; LÁZZARI, S.M.N. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**. São Paulo. v.47, n.4, p.625-630, dez., 2003.

CASTRILLO, L.A.; ROBERTS, D.W.; VANDENBERG, J.D. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.89, p.46-56, 2005.

CERUTI, F.C.; LÁZZARI, S.M.N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**. São Paulo, v.47, n.3, 2003.

COODETEC - Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. **Híbridos de Milho**. Comunicado Técnico. jan., 2005.

CRUZ, I. Controle Biológico em Manejo Integrado de Pragas. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. 1.ed. São Paulo: Manole, cap.32, p. 543-579, 2002.

DAL BELLO, G.; PADIN, S.; LÓPEZ LASTRA, C.; FABRIZIO, M. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. **Journal of Stored Products Research**. v.37, p.77-84, 2001.

DE LA ROSA, W.; ALATORRE, R.; TRUJILLO, J.; BARRERA, J.F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) Strains Against the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scotlytidae). **Journal of Economic Entomology**. v.90, n.6, p.1534-1538, dez., 1997.

DEPIERI, R.A.; MARTINEZ, S.S.; MENEZES JÚNIOR, A.O. Compatibility of the Fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. **Neotropical Entomology**. v.34, n.4, p.601-606, jul./ago., 2005.

DIODATO, M.A.; SANTOS, H.R. Crescimento Micelial e Diâmetros das Colônias de *Beauveria bassiana* (Linhagens SnLt), quando submetidos a diferentes Fotoperíodos e à luz Ultravioleta. **Agrárias**. v.12, n.1/2, p.61-66, 1992/1993.

FALEIRO, F. G.; PICANÇO, M.; MIRANDA, M. M. M.; ARAÚJO, J. M.; SARAIVA, L. S.; Resistência de 49 populações de milho a *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.20, n.1/2, p.17-21, 1995.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. Situação atual e perspectivas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.22, p.18-21, set./out., 2001.

FERREIRA, D.F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Disponível em www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm. Acessado em 23.12.2005.

FIGUEIRA, L.K.; LARA, F.M.; CRUZ, I.; WAQUIL, J.M. Integração da Resistência de Plantas e Predação por *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) para o Manejo de *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) em Sorgo. **Neotropical Entomology**. v.32, n.3, p.487-492, jul./sep., 2003.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v.10, 920p.

GARCIA, R.; CALTAGIRONE, L.E.; GUTIERREZ, A.P. Comments on a redefinition of biological control. **BioScience**. v.38, n.10, p.692-694, nov., 1988.

GIUSTOLIN, T.A., VENDRAMIM, J.D., ALVES, S.B., VIEIRA, S.A. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. **Neotropical Entomology**. v.30, n.3, p.417-421, set., 2001a.

GIUSTOLIN, T.A., VENDRAMIM, J.D., ALVES, S.B., VIEIRA, S.A. Efeito associado de Genótipo de Tomateiro Resistente e *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**. v.30, n.3, p.461-465, set., 2001b.

GONZÁLEZ G., M.T.; POSADA F., F.J.; BUSTILLO P., A.E. Bioensayo Para Evaluar La Patogenicidad De *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre La Broca Del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). **Revista Colombiana de Entomologia**. v.19, n.4, p.123-130, 1993.

GUDRUPS, I.; FLOYD, S.; KLING, J.G.; BOSQUE-PEREZ, N.A.; ORCHARD, J.E. A comparison of two methods of assesment of maize varietal resistance to the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, and the influence of kernel hardness and size on susceptibility. **Journal of Stored Products Research**. v.37, p.287-302.

GUEDES, R.N.C. Manejo Integrado para a Proteção de Grãos Armazenados contra Insetos. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.15/16, n.1/2, p.3-48, jun./dez. 1990/1991.

GUZZO, E.C.; ALVES, L.F.A.; ZANIN, A.; VENDRAMIN, J.D.; Identificação de materiais de milho resistentes ao ataque de gorgulho *Sitophilus zeamais* (Mots., 1855) (Coleoptera : Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.69-73, abr./jun., 2002.

HADDAD, M.L. Utilização do Pólo-PC para análises de Probit. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.34, p.999-1013, 1998.

HATTING, J.L.; WRAIGHT, S.P.; MILLER, R.M. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) for Control of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae) on Resistant Wheat Under Field Conditions. **Biocontrol Science and Technology**. v.14, n.5, p.459-473, aug., 2004. /Resumo/

HIDALGO, E.; MOORE, D.; LE PATOUREL, G. The Effect of Different Formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in Stored Maize. **Journal of Stored Product Research**. v.34, n.2/3, p.171-179, 1998.

HIROSE, E.; NEVES, P.M.O.J.; ZEQUI, J.A.C.; MARTINS, L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO JÚNIOR, A. Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sorok. **Brazilian Archive of Biological Technique**. v.44, p.409-423, 2001.

KASSA, A.; ZIMMERMANN, G.; STEPHAN, D.; VIDAL, S. Susceptibility os *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to Entomopathogenic Fungi from Ethiopia. **Biocontrol Science and Technology**. v.12, n.6, p.727-736, dec., 2002. /Resumo/

KIM, S.K.; KOSSOU, D.K. Responses and genetics of maize germplasm resistant to the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulski in West Africa. **Journal of Stored Products Research**. v.39, p.489-505, 2003.

KOGAN, M.; BAJWA, W.I. Integrated Pest Management: A Global Reality? **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.28, n.1, p.1-25, mar., 1999.

KORUNIC, Z. Diatomaceous Earths, a Group of Natural Insecticides. **Journal of Stored Products Research**. v.34, n.2/3, p.87-97, 1998.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAILS, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? **Biological Control**. v.21, p.230-248, 2001.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336p.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de Fungos Entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92p.

LIU, H; SKINNER, M.; BROWNBRIDGE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v.82, p.139-147, 2003.

LORD, J.C. Desiccant Dusts Synergize the Effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on Stored-Grain Beetle. **Journal of Economic Entomology**. v.94, n.2, p.367-372, apr., 2001.

LORD, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.89, p.19-29, 2005.

LORINI, I. **Controle integrado de Pragas de Grãos Armazenados**. Passo Fundo: Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1998. 52p.

LORINI, I. **Pragas de Grãos de Cereais Armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1999. 60p.

LORINI, I.; FERREIRA FILHO, A.; BARBIERI, I., DERMAMAN, N.A.; MARTINS, R.R.; DALBELLO, O. Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v.2, n.4, p.32-36, out./dez., 2001.

LORINI, I. **Produto Natural à base de Terra de Diatomáceas para Controle das Pragas de Grãos Armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. jan., 2002a. 8p.

LORINI, I. Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados. **Embrapa: Comunicado Técnico**, n.17. Passo Fundo: Embrapa Trigo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. p.1-4, maio, 2002b.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors Affecting Conidial Production of *Beauveria bassiana* from Fungus-Killed Cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.72, p.97-103, 1998.

LUZ, C.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; TIGANO, M.S. Sporulation of *Beauveria bassiana* on Cadavers of *Triatoma infestans* after infection at Different Temperatures and Doses of Inoculum. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.73, p. 223-225, 1999.

MARSARO JÚNIOR, A.L.; LAZZARI, S.M.N.; KADOZAWA, P.; HIROOKA, E.Y.; GERAGE, A.C. Avaliação da resistência de híbridos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) no grão armazenado. **Ciências Agrárias**. Londrina, v.26, n.2, p.165-170, abr./jun., 2005a.

MARSARO JÚNIOR, A.L.; LAZZARI, S.M.N.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y. Inibidores de Amilase em híbridos de Milho como fator de Resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**. v.34, n.3, p.443-450, mai./jun., 2005b.

MATIOLI, J.C.; ALMEIDA, A.A. Alterações nas características químicas dos grãos de milho causadas pela infestação de *Sitophilus oryzae* (L., 1763): I – Umidade e Composição Mineral. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.4, n.1, p.36-46, 1979a.

MATIOLI, J.C.; ALMEIDA, A.A. Alterações nas características químicas dos grãos de milho causadas pela infestação de *Sitophilus oryzae* (L., 1763): II – Teor e Índice de acidez do óleo. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.4, n.1, p. 47-56, 1979b.

MATIOLI, J.C.; ALMEIDA, A.A. Alterações nas características químicas dos grãos de milho causadas pela infestação de *Sitophilus oryzae* (L., 1763): III – Nitrogênio Total e Carboidratos. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.4, n.1, p. 57-68, 1979c.

MATIOLI, J.C. Estimativas dos danos provocados em grãos de milho pelo ataque de *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.6, n.1, p.43-53, 1981.

MEWIS, I.; ULRICHS, C. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. **Journal of Stored Products Research**. v.37, p.153-164, 2001.

MIRANDA; M.M.M.; ARAÚJO, J.M.; PICANÇO, M.; FALEIRO, F.G.; MACHADO, A.T. Detecção de não-preferência à *Sitophilus zeamais* Mots. em espigas e grãos de 49 populações de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.20, n.1/2, p.21-25, 1995.

MOINO JUNIOR, A.; ALVES, S.B.; Determinação de Concentração de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para o Controle de Insetos-Pragas de Grãos Armazenados. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p.15-19, abril, 1997.

MOINO JUNIOR., A.; ALVES, S.B. Efeito de *Beauveria bassiana* sobre o Desenvolvimento de *Sitophilus zeamais*. **Manejo Integrado de Plagas**. Costa Rica, n.50, p.51-54, 1998.

MOINO JUNIOR., A.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Efficacy of *Beauveria bassiana* (bálsamos) Vuillemin isolates for control of stores-grains pests. **Journal of Applied Entomology**., Berlin, n.122, p.301-305, 1998.

NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. Utilização de Agentes Microbianos de Controle de Praga: Mercado, Riscos e Regulamentações. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cap.8, p.231-262, 1998.

NEVES, M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* Para o Controle Biológico da Broca-do-Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**. v.34, n.1, p.77-82, jan./fev., 2005.

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

PACHECO, I.A.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados: Identificação e Biologia**. Campinas: Fundação Cargill, 1995. 228p.

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

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de Alimentos por Insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.) **Ecologia Nutricional de Insetos e suas implicações no Manejo de Pragas**. São Paulo: Manole, cap. 2, p.9-66, 1991. 359p.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. 1.ed. São Paulo: Manole, cap.1, p.1-16. 2002a. 609p.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. O Futuro do Controle Biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. 1.ed. São Paulo: Manole, cap.33, pág. 581-587. 2002b. 609p.

PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; REIS, P.R. Segurança no emprego de entomopatógenos. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.6, p.171-194, 1998a.

PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.38, p.1097-1118, 1998b.

PLAZAS, I.H.A.Z.; MEDINA, P.F.; NOVO, J.P.S. Viabilidade de Sementes de Trigo Tratadas com Fenitrotions e infestadas por *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) durante o armazenamento. **Bragantia**. v.62, n.2, p.315-327, 2003.

PROCÓPIO, S.O.; VENDRAMIM, J.D.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I.; SANTOS, J.B. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**. v.27, n.6, p.1231-1236, nov./dez., 2003.

RAMALHO, F.S.; ROSETTO, C.J.; NAGAI, V.; Relação entre dureza do milho e resistência a *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855. **Ciência e Cultura**. v.28, n.12, p.1505-1506, dez., 1976.

RAMALHO, F.S.; ROSSETO, C.J.; NAGAI, V. Comportamento de Germoplasmas de milho sob a forma de palha e grãos debulhados em relação a *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855. **Ciência e Cultura**. v.29, n.5, p.584-590, mai, 1977.

RICE, W.C.; COGBURN, R.R. Activity of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Against Three Coleopteran Pests of Stored Grain. **Journal of Economic Entomology**. v.92, n.3, p.691-694, june, 1999.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; BRESSAN, D.F.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; PINTO, D.O.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de Isolados de fungos para o controle do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**. 2006. /No prelo/

SANTOS, J.P.; FOSTER, J.E.; Identificação de grãos de milho resistentes ao gorgulho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.16, n.1, p.39-43, jan., 1981a.

SANTOS, J.P.; FOSTER, J.E.; Preferência e reprodutividade do Gorgulho do milho como fator de resistência em algumas populações e linhagens de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.16, n.6, p.769-775, nov./dez. 1981b.

SANTOS, J.P.; FOSTER, J.E. Mecanismos de Resistência do grãos de Milho ao Gorgulho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.18, n.10, p.1059-1063, out., 1983.

SANTOS, J.P. Recomendação para o Controle de Pragas de Grãos e de Sementes Armazenadas. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Cultura do Milho**: Fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, p.197-233, 1993.

SANTOS, T.M.; FIGUEIRA, L.K.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; LARA, F.M.; CRUZ, I. Efeito da alimentação de *Schizaphis graminum* com genótipos de sorgo no desenvolvimento do predador *Cycloneda sanguinea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.38, n.5, p.555-560, maio, 2003.

SANTOS, S.B.; AFONSO, A.D.L.; JUNIOR, F.A.R.; KUMMER, A.C.B. Resistência de Diferentes Híbridos de Milho a Infestação do *Sitophilus* sp. em testes de Preferência com Livre Escolha. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, **Anais**. Canoas, 2005.

SGARBIERO, E.; TREVISAN, L.R.P.; BAPTISTA, G.C. Pirimiphos-Methyl Residues in Corn and Popcorn Grains and Some of their Processed Products and the Insecticide Action on the Control of *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**. v.32, n.4, p.707-711, oct./dec., 2003.

SIMON, C.W. Controle Biológico e Integrado de Pragas. **Revista dos Engenheiros Agrônomos**. n.6, p.24-25, jun. 1999.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MARCHINI, L.C. Variation in the susceptibility of *Bombyx mori* L. to Nucleopolyhedrovirus when reared on different mulberry genotypes. **Journal of Applied Entomology**. v.111, n.3, p.318-320, 1991.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B. Impacto Ambiental de Entomopatógenos. In: ALVES, S.B.(ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap.37, p.1075-1095, 1998.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B. Temperature and Relative Humidity Requirements for Conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes:

Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v.29, n.3, p.515-521, set., 2000.

SPADOTTO, C.A. Agroquímicos: Ambiente em Perigo. **Cultivar**. n.43, p.20-26, set., 2002.

STATHERS, T.E.; DENNIFF, M.; GOLOB, P. The efficacy and persistence of diatomaceous earths admixed with commodity against four tropical stored product beetle pests. **Journal of Stored Products Research**. v.40, p.113-123, 2004.

TAVARES, M.A.G.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosoides* L., Sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**. v.34, n.2, p.319-323, mar./abr., 2005.

THRONE, J.E.; EUBANKS, M.W. Resistance of Tripsacorn to *Sitophilus zeamais* and *Oryzaephilus surinamensis*. **Journal of Stored Products Research**. v.38, p.239-245, 2002.

TIPPING, P.W.; MIKOLAJCZAK, K.L.; RODRIGUEZ, J.G.; PONELEIT, C.G.; LEGG, D.E. Effects of whole Corn Kernels and Extracts on Behavior of Maize Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**. v.80, n.5, p.1010-1013, oct., 1987.

TIPPING, P.W.; RODRIGUEZ, J.G.; PONELEIT, C.G.; LEGG, D.E. Feeding Activity of the Maize Weevil (Coleoptera: Curculionidae) on Two Dent Corn Lines and Some

of their Mutants. **Journal of Economic Entomology**. v.81, n.3, p.830-833, jun.,1988.

TOSCANO, L.C.; BOIÇA JUNIOR., A.L.; LARA, F.M.; WAQUIL, J.M.; Resistência e mecanismos envolvidos em genótipos de milho em relação ao ataque do gorgulho, *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.28, n.1, p.141-147, mar., 1999.

Van den BOSCH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. **An Introduction to Biological Control**. Plenum Press: New York/London, 1982. cap.2, p.9-19: The Ecological Basis for Biological Control. 247p.

Van DRIESCHE, R.G.; BELLOWS JÚNIOR, T.S. **Biological Control**. Chapman & Hall: London, 1996. cap.1, p.3-33: Pest Origins, Pesticides, and the History of Biological Control. 539p.

VENDRAMIM, J.D.; NAKANO, O.; PARRA, J.R.P. **Pragas dos Produtos Armazenados**. Curso de Entomologia aplicado à agricultura. Manual de curso à distância. Piracicaba: FEALQ, 1992. 760p.

VENDRAMIM, J.D. O Controle Biológico e a Resistência de Plantas. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. 1.ed. São Paulo: Manole, cap. 30, p.511-528, 2002.

VOWOTOR, K.A.; BOSQUE-PÉREZ, N.A.; AYERTEY, J.N. Effect of maize Variety and Storage Form on the Development of the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Journal of Stored Products Research**. v.31, n.1, p.29-36, 1995.

WANDERLEY, P.A.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; RAMALHO, F.S. Influencia de Cultivares de Batata-Doce Resistentes e Suscetíveis a *Euscepes postfasciatus* Fairmaire (Coleoptera: Curculionidae) sobre o Parasitismo, Sobrevivência e a Biologia de *Catolaccus grandis* Burks (Hymenoptera: Pteromalidae). **Neotropical Entomology**. v.32, n.1, p.139-143, jan./mar., 2003.

WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; CRUZ, I. Cultivo do Milho: Manejo Integrado de Pragas (MIP). **Embrapa: Comunicado Técnico**, n.50. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, dez., 2002.