

Eficiência de fungos entomopatogênicos para o controle de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório

Thiago Trevisoli Agostini, Lucas Trevisoli Agostini, Rogério Teixeira Duarte*, Haroldo Xavier Linhares Volpe, Claudio Salas, Ricardo Antonio Polanczyk

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) - Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil

*Autor correspondente, e-mail: rogerioteixeira_1@hotmail.com

Resumo

O objetivo da pesquisa foi avaliar, em condições de laboratório, a eficiência de isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* no controle populacional de *Sitophilus oryzae*. Foram realizados bioensaios com os isolados de *B. bassiana*, IBCB 01, IBCB 17 e IBCB 18, e *I. fumosorosea*, ARSEF 7050, os produtos comerciais a base de *B. bassiana* (Boveril®, PM) e *M. anisopliae* (Metarril®, PM) e os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* cultivados em arroz, produzidos em usinas de cana-de-açúcar. Adultos não separados por sexo de *S. oryzae* foram imersos em solução de conídios na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios viáveis / mL e acondicionados em placas de Petri contendo grãos de milho. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições, com quinze insetos cada, e a mortalidade avaliada diariamente, por um período de 15 dias. Com exceção do isolado de *M. anisopliae* obtido de usina de cana-de-açúcar, os demais entomopatogênicos analisados foram patogênicos à *S. oryzae*, porém, causaram baixa mortalidade, que variou entre 5 a 25%, sendo pouco promissores para adoção como medida de controle desse inseto em grãos de milho armazenados.

Palavras-chave: controle microbiano, entomopatogênicos, gorgulho, grãos armazenados

Efficiency of entomopathogenic fungi to the control of *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions

Abstract

The objective of this research was to evaluate, under laboratory conditions, the efficiency of strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea* to control *Sitophilus oryzae*. We performed bioassays with *B. bassiana* strains, IBCB 01, IBCB 17 e IBCB 18, and *Isaria fumosorosea* strain, ARSEF 7050, the commercial products of *B. bassiana* (Boveril®, PM) and *M. anisopliae* (Metarril®, PM) and strains of *B. bassiana* and *M. anisopliae* grown in rice, cultivated by sugarcane mill. Unsexed adults of *S. oryzae* were immersed in a solution with 1.0×10^8 viable conidia / mL and placed in Petri dishes containing corn grains. For each strain we performed four replicates with fifteen insects each and the mortality was evaluated daily, for 15 days. Except for *M. anisopliae* strain obtained from sugarcane mill, the others entomopathogens tested were pathogenic to *S. oryzae*, however, caused low mortality, which range between 5 to 25%, with low possibility to be adopted as a control method for this insect in stored corn grains.

Keywords: entomopathogens, microbial control, maize weevil, stored grains

Recebido: 13 Maio 2013
Aceito: 05 Março 2014

Introdução

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.), com a soma da produção de grãos das safras 2011/2012 totalizando 69,48 milhões de toneladas e uma área de plantio estimada em 7,23 milhões de hectares para a safra de 2012, tendo como principal destino as indústrias de rações para animais, correspondendo entre 70 a 80% do total de grãos produzidos (Garcia et al., 2006; Mapa, 2012).

O armazenamento deste produto requer muita atenção, pois os grãos podem sofrer diversas influências negativas de determinados fatores, como temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio, micro-organismos, roedores, pássaros e insetos-praga (Embrapa, 2009). A redução quantitativa e qualitativa dos grãos armazenados de milho, propiciadas pelo ataque de insetos considerados pragas agrícolas, pode apresentar valores entre 10 a 20% do total produzido pelo Brasil (Beskow & Deckers, 2002). Dentre os insetos-praga mais importantes de grãos armazenados, destacam-se as espécies *Sitophilus oryzae* L. e *S. zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) (Rosseto, 1966; Lorini, 1999).

Estas espécies apresentam infestação cruzada, a qual é responsável por deteriorar os grãos de milho tanto em áreas de campo como em armazenamento, além de apresentarem polifagia e elevado potencial biótico, fatores que dificultam o controle populacional destas pragas (Lorini, 2002). Entre os prejuízos causados, destacam-se a redução no peso e valor nutritivo do grão, diminuição da viabilidade da semente, aquecimento e deterioração, poluição da massa de grãos e disseminação de fungos na massa de grãos (Athié et al., 1998; Lorini, 1999), o que torna o produto impróprio para o consumo humano e alimentação animal (Caneppele et al., 2003).

Para o controle destas espécies, muitos inseticidas são utilizados, principalmente o grupo químico dos piretróides e organofosforados, além dos fumigantes, representados pela elevada periculosidade e com período de carência específico (Lorini, 1998; Sgarbiero et al., 2003). O uso inadequado desses produtos pode

ocasionar falhas durante o processo de controle de pragas, que culmina na elevação dos custos, maior presença de resíduos químicos nos grãos e o rápido desenvolvimento de resistência por parte das espécies que estão expostas continuamente a estas aplicações fitossanitárias (Ribeiro et al., 2003; Daghli, 2004).

Para minimizar esta problemática, o método de controle biológico com micro-organismos entomopatogênicos constitui-se como uma tática viável e vantajosa, especialmente quanto à redução do impacto ambiental e contaminação do produto com resíduos, maior segurança para sua manipulação, menor custo de aplicação e especificidade e também por não selecionar populações resistentes de pragas e não ocasionar problemas qualitativos e quantitativos aos grãos armazenados (Franceschini, 2001), representados principalmente pelos grupos de fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, rickétsias e micoplasma (Alves, 1998).

Dentre os entomopatógenos, os fungos são os organismos que apresentam maior potencial no controle de *Sitophilus* spp., pois seu modo de ação é baseado, principalmente, no contato do inseto com as estruturas reprodutivas destes micro-organismos (Alves & Lecuona, 1998), além de apresentarem elevada capacidade de dispersão horizontal (Castrillo et al., 2005).

Os fungos entomopatogênicos considerados de maior potencial para o controle de pragas de grãos armazenados são *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Athanassiou & Steenberg, 2007; Rondelli et al., 2012), cuja variabilidade genética pode interferir na virulência de isolados destas espécies, além da linhagem, idade, distribuição espacial, densidade populacional da praga alvo e condições ambientais, também responsáveis por tornar uma linhagem mais ou menos virulenta quando em comparação com outra linhagem de determinada espécie (Alves, 1998). Porém, pesquisas com outros fungos entomopatogênicos devem ser realizadas com o propósito de selecionar micro-organismos patogênicos a pragas de grãos armazenados com elevada virulência a determinada espécie-praga.

Em vista disso, o objetivo da pesquisa foi avaliar, em condições de laboratório, a eficiência de isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Wise) no controle populacional de *S. oryzae*.

Material e Métodos

Manutenção da criação de *Sitophilus oryzae*

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes da criação massal do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), Departamento Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), mantidos em recipientes plásticos cilíndricos, com diâmetro de 15 cm e capacidade de 5 L, cobertos por um fino tecido "voil" adaptado na parte superior da estrutura, com o propósito de permitir as trocas gasosas entre os meios. Cada recipiente continha 1.000 g de grãos secos de milho (*Z. mays*) e infestados com aproximadamente 200 adultos de *S. oryzae*. Após 15 dias de infestação, os grãos foram peneirados, e os insetos separados da massa de grãos, sendo os mesmos transferidos para novos recipientes contendo o referido substrato. A criação foi mantida à temperatura de 28 ± 1 °C e umidade relativa de $65 \pm 5\%$.

Manipulação dos fungos entomopatogênicos

Os isolados de *B. bassiana* utilizados no experimento foram IBCB 01, IBCB 17 e IBCB 18, pertencentes ao Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes-Praga (LCMAP) (FCAV/UNESP). Estes isolados foram multiplicados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura BDA (Batata + Dextrose + Agar), incubados em câmara de crescimento (B.O.D.) a 28 ± 1 °C e 12 h de fotofase, por um período de oito dias. O isolado de *I. fumosorosea* (ARSEF 7050), também procedente do referido Banco de Entomopatógenos, foi multiplicado em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura SDAY (Neopeptona + Dextrose + Levedura + Agar) e incubado sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, os conídios foram coletados das placas de Petri raspando-

se a superfície do meio de cultura, transferidos e armazenados em frascos de vidro esterilizados e acondicionados em refrigerador à temperatura de -10 °C por um período inferior a 15 dias (Alves, 1998).

Também foram testados os formulados comerciais dos fungos *B. bassiana* (Boveril®, pó molhável, $5,0 \times 10^8$ conídios viáveis por grama, Itaforte Bio Produtos) e *M. anisopliae* (Metarril®, pó molhável, $5,0 \times 10^8$ conídios viáveis por grama, Itaforte Bio Produtos) através da diluição de 10 g do produto comercial em 100 mL de água destilada e deionizada. Outros dois tratamentos foram compostos dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* cultivados em arroz, produzidos em usinas de cana-de-açúcar. Para a remoção do fungo, 1 g de arroz foi lavado com água destilada e deionizada até a obtenção de 10 mL de solução.

As soluções de conídios dos respectivos fungos entomopatogênicos foram preparadas com água destilada e deionizada acrescida do espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%), posteriormente quantificadas em câmara de Neubauer e padronizadas na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios viáveis / mL.

Avaliação da patogenicidade

Nos bioensaios, adultos não separados por sexo de *S. oryzae*, com 20 a 30 dias de vida, foram imersos em 15 mL da solução de conídios na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios viáveis / mL com auxílio de uma peneira e agitados manualmente por um período de 10 segundos para permitir o contato do tegumento dos insetos com as caldas inseticidas, e retirar o excesso de calda após a imersão. Na testemunha, os insetos foram imersos em solução aquosa de espalhante adesivo Tween® 80 (0,01%).

Em seguida, os insetos foram acondicionados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo papel filtro e 20 g de grãos secos de milho, vedadas com plástico filme PVC, perfurado com auxílio de um alfinete para permitir as trocas gasosas. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições, com quinze insetos cada. As placas foram mantidas em sala climatizada, a temperatura de 28 ± 1 °C, umidade relativa de $48 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente, por um período de 15 dias, sendo os cadáveres dos insetos separados e acondicionados, individualmente, em placas de Petri contendo algodão umedecido (câmara úmida), mantidas em câmara de crescimento (B.O.D.) com temperatura de 28 ± 1 °C e fotofase de 12 h, por um período de 12 dias, para a confirmação da mortalidade pelo patógeno através da formação de estruturas reprodutivas do fungo no corpo do inseto. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12×5 , em que o primeiro fator representa os fungos entomopatogênicos utilizados e testemunha e o segundo fator o período de avaliação em dias. Os dados foram transformados em $\log(x + 5)$ e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Com exceção do isolado de *M. anisopliae* obtido de usina de cana-de-açúcar, os demais produtos comerciais ou isolados dos micro-organismos analisados foram patogênicos

para adultos de *S. oryzae*. Porém, os referidos entomopatógenos causaram baixa mortalidade, que variou entre 5 a 25% (Tabela 1). Devido à reduzida mortalidade, não foi possível estimar a virulência dos entomopatógenos.

Os períodos compreendidos entre o início das avaliações até o sexto dia e entre o décimo terceiro e décimo quinto dias não apresentaram diferença significativa em relação à mortalidade de adultos de *S. oryzae* para os diferentes tratamentos com os fungos entomopatogênicos. Entre o sétimo e nono dias de avaliação, a mortalidade causada pelo produto Boveril® e o isolado de *B. bassiana* (Usina) apresentaram resultados significativos quando comparados com a testemunha, com mortalidade atingindo valor de 6,67% e 8,33%, respectivamente. Para o período compreendido entre o décimo e décimo segundo dias de avaliação, apenas o isolado de *B. bassiana* (Usina) apresentou diferença significativa em relação à testemunha, com mortalidade de 10%. Os demais entomopatógenos testados não apresentaram resultados significativos quando comparados à testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade média (%) de adultos de *Sitophilus oryzae* expostos aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (temperatura de 28 ± 1 °C, umidade relativa de $48 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h)

Tratamentos	Período de Avaliação (dias)					Total	F	d.m.s.	C.V. (%)
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15				
Testemunha	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Aa	0,00 c	0,00 ^{ns}	0,00	0,00
<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IBCB 17	0,00 Aa	0,00 Aa	1,67±0,06 Aab	1,67±0,06 Ab	1,67±0,06 Aa	5,01±0,10 bc	0,50 ^{ns}	0,3131	18,97
IBCB 01	3,33±0,06 Aa	1,67±0,05 Aa	0,00 Ab	1,67±0,06 Ab	3,33±0,07 Aa	10,00±0,11 ab	0,75 ^{ns}	0,3905	22,04
IBCB 18	3,33±0,06 Aa	5,00±0,11 Aa	1,67±0,06 Aab	3,33±0,11 Aab	5,00±0,06 Aa	18,33±0,10 a	0,39 ^{ns}	0,5083	26,27
Isolado Usina	0,00 Ba	5,00±0,11 Aa	8,33±0,00 Aa	10,00±0,07 Aa	1,67±0,06 Ba	25,00±0,11 a	5,89 ^{ns}	0,3446	16,92
Boveril® PM	0,00 Ba	3,33±0,06 Aa	6,67±0,00 Aa	0,00 Ba	0,00 Ba	10,00±0,06 ab	12,00 ^{ns}	0,2087	11,78
<i>Metarhizium anisopliae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolado Usina	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Aa	0,00 c	0,00 ^{ns}	0,00	0,00
Metaril® PM	3,33±0,06 Aa	0,00 Aa	1,67±0,06 Aab	0,00 Ab	0,00 Aa	5,00±0,06 bc	1,71 ^{ns}	0,2761	16,73
<i>Isaria fumosorosea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARSEF 7050	0,00 Aa	0,00 Aa	1,67±0,06 Aab	1,67±0,06 Ab	0,00 Aa	3,34±0,07 bc	0,75 ^{ns}	0,2556	15,88
F	0,03 ^{ns}	1,71 ^{ns}	5,62 ^{ns}	4,08 ^{ns}	2,48 ^{ns}	12,01 ^{ns}	-	-	-
d.m.s.	0,2935	0,3854	0,2935	0,3486	0,3055	0,3708	-	-	-
C.V. (%)	16,19	20,70	14,98	18,35	16,63	15,02	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$); ^{ns} significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; ^{ns} não significativo

Em relação ao tempo de ação dos produtos/isolados sobre *S. oryzae*, foi possível observar que o isolado de *B. bassiana* (Usina) apresentou maior eficiência de controle entre o quarto e décimo segundo dia após

contato inicial com o inseto, porém apenas o período entre o primeiro e terceiro dias diferiu significativamente em relação ao décimo e décimo segundo dia de avaliação. O produto comercial Boveril® causou maior mortalidade

entre o quarto e nono dia após exposição aos insetos, com diferença significativa apenas para o período compreendido entre o sexto e nono dia em relação aos demais períodos analisados. Dessa maneira, Boveril® apresentou ação mais rápida, porém menos duradoura, em relação ao isolado obtido da usina de cana-de-açúcar (Tabela 1).

Os tratamentos com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* foram os responsáveis por promover maior mortalidade de adultos de *S. oryzae* quando comparados com os demais entomopatógenos, representados principalmente pelo isolado obtido da usina de cana-de-açúcar e do isolado IBCB 18, com 25 e 18,33% de mortalidade, respectivamente (Tabela 1). Bello et al. (2000) também obtiveram maior eficiência de controle de adultos de *S. oryzae* com isolados de *B. bassiana* quando comparado com os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii* e *Isaria farinosa*. O entomopatógeno *B. bassiana*, quando utilizado no controle de *S. zeamais* Mots. também ocasionou maior mortalidade em comparação com *M. anisopliae* (Potrich et al., 2006).

Quanto à relação patógeno-hospedeiro, o processo de infecção inicia-se pela adesão da estrutura reprodutiva do fungo na cutícula do inseto, podendo ser específico ou não específico (Fargues, 1984). Para *B. bassiana* e *M. anisopliae* este mecanismo não é específico, sendo relacionado à camada hidrofóbica presente na superfície destas estruturas (Boucias et al., 1988). Além deste mecanismo, existem complexos específicos representados por substâncias químicas secretadas por fungos entomopatogênicos, que são responsáveis por facilitar a adesão das estruturas reprodutivas na cutícula do inseto (Boucias et al., 1988), fatores que podem ter influenciado na baixa mortalidade de *S. oryzae* no início das avaliações.

Além destes mecanismos, a reduzida capacidade do entomopatógeno em utilizar os nutrientes disponíveis na superfície da cutícula do inseto para seu desenvolvimento e a ausência de características necessárias para o reconhecimento de um hospedeiro suscetível ou do local de infecção penetrável são importantes fatores para a ausência ou reduzida infecção

de um fungo entomopatogênico em relação à determinada espécie de inseto (Hajek & St. Leger, 1994).

Durante o processo germinativo, a velocidade pela qual a estrutura reprodutiva do fungo consegue penetrar na cutícula do inseto pode ser dependente do isolado utilizado, das condições ambientais, da espessura da cutícula do inseto, do passado térmico das estruturas reprodutivas, da densidade do conídio e da variedade de enzimas extracelulares sintetizadas por fungos entomopatogênicos responsáveis pela degradação da cutícula (Alves, 1998; Hajek et al., 2002). O fungo pode demorar até três dias para penetrar na cutícula do inseto (Moino Junior et al., 2002).

A mortalidade significativa observada a partir do sétimo dia pode estar relacionada à penetração fúngica no tegumento do inseto através da combinação dos processos de pressão mecânica e ação enzimática (Arruda et al., 2005). As enzimas sintetizadas pelos fungos entomopatogênicos, responsáveis pela degradação da maioria dos componentes da cutícula dos insetos, são compostas principalmente por proteases, quitinases e esterases (Charley & St. Leger, 1991), com variabilidade quanto à composição em relação à espécie e/ou isolado do entomopatógeno, que pode ter sido um importante fator para com a diferença na mortalidade de *S. oryzae* quando exposta aos diferentes fungos entomopatogênicos, sendo também observada por Leal et al. (1997).

Posteriormente ao processo de germinação e penetração do fungo entomopatogênico na cutícula do inseto, ocorrerá à colonização, infecção generalizada e mortalidade, que perdura entre três a dez dias após o contato dos conídios com o inseto, dependente de fatores limitantes como componentes nutricionais da cutícula, reações químicas e ação de micotoxinas (Li et al., 2012), com importância em relação a virulência de determinado entomopatógeno (Zhang et al., 2008).

A variabilidade genética existente entre isolados de fungos entomopatogênicos de mesma espécie também está intimamente

correlacionada com variações de mortalidade dos insetos oriundos de tratamentos com isolados distintos, porém de mesma espécie (Rondelli et al., 2012), principalmente quanto a capacidade de penetração na cutícula do inseto e/ou resistência a substâncias de defesa produzidas pelo mesmo (Alves, 1998; Li et al., 2012). Embasado nestas informações, os resultados da presente pesquisa podem ter sido influenciados pela presença ou ausência de mecanismos específicos e não específicos, além de outras características intrínsecas e extrínsecas, responsáveis pela variabilidade da mortalidade de *S. oryzae*.

Conclusões

A maioria dos isolados e produtos comerciais dos fungos entomopatogênicos analisados foram patogênicos a adultos de *Sitophilus oryzae*, porém pouco promissores para adoção como medida de controle desse inseto, devido à baixa mortalidade observada.

Referências

Alves, S.B. 1998. *Controle microbiano de insetos*. FEALQ, Piracicaba, Brasil. 1163 p.

Alves, S.B., Lecuona, R.E. 1998. Epizootologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. FEALQ, Piracicaba, Brasil. p. 97-170.

Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37: 231-244.

Athanassiou, C.G., Steenberg, T. 2007. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control* 40: 411-416.

Athié, I., Castro, M.F.P.M., Gomes, R.A.R., Valentini, S.R.T. 1998. *Conservação de grãos*. Fundação Cargill, Campinas, Brasil. 236 p.

Bello, G.D., Padin, S., Lastra, C.L., Fabrizio, M. 2000. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. *Journal of Stored Products Research* 37: 77-84.

Beskow, P., Deckers, D. 2002. Legislação brasileira de armazenamento de grãos. In: Lorini, I., Miike, L.H., Scussel, V.M. (Eds.) *Armazenagem de grãos*.

Geneziz, Campinas, Brasil. p. 27-53.

Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1795-1805.

Caneppele, M.A.B., Caneppele, C., Lazzari, F.A., Lazzari, S.M.N. 2003. 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* 47: 625-630.

Castrillo, L.A., Roberts, D.W., Vandenberg, J.D. 2005. The fungal past, present and future: germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 46-56.

Chamley, A.K., St. Leger, R.J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. In: Cole, G.T., Hoch, H.C. (Eds.) *The fungal spore in disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, USA. p. 267-287.

Daglish, G.J. 2004. Effect of exposure period on degree of dominance of phosphine resistance in adults of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science* 60: 822-826.

Embrapa. Cultivo do milho: colheita e pós-colheita. 2009. http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/colpragas.htm. <Acesso em 02 Out. 2012>

Fargues, J. 1984. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Aist, J., Roberts, D. W. (Eds.) *Infection process of fungi*. Rockefeller Foundation Study Center, Bellagio, Italy. p. 90-110.

Franceschini, M., Guimarães, A.P., Camassola, M., Frazzon, A.P., Baratto, C.M., Kogler, V., Silva, M.V., Dutra, V., Nakazoto, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 31: 32-37.

Garcia, J.C., Mattoso, M.J., Duarte, J.O., Cruz, J.C. 2006. *Aspectos econômicos da produção e utilização do milho*. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brasil. 12 p.

Hajek, A.E., St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.

Hajek, A.E., Davis, C.I., Eastburn, C.C., Vermeulen, F.M. 2002. Deposition and germination of conidia of the entomopathogen *Entomophaga maimaiga* infecting larvae of gypsy moth,

- Lymantria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 37-43.
- Leal, S.C.M., Bertioli, D.J., Butt, T.M., Carter, J.H., Burrows, P.R., Peberdy, J.F. 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 101: 257-265.
- Li, Y., Zhao, P., Liu, S., Dong, Z., Chen, J., Xiang, Z., Xia, Q. 2012. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42: 766-775.
- Lorini, I. 1998. *Controle integrado de pragas de grãos armazenados*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, Brasil. 52 p.
- Lorini, I. 1999. *Pragas de grãos de cereais armazenados*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, Brasil. 60 p.
- Lorini, I., Miike, L.H., Scussel, V.M. 2002. *Armazenagem de Grãos*. Instituto Biogeneziz, Campinas, Brasil. 1000 p.
- Mapa. Milho. 2012. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>. <Acesso em 07 Set. 2012>
- Moino Junior, A., Alves, S.B., Lopes, R.B., Neves, P.M.O.J., Pereira, R.M., Vieira, S.A. 2002. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola* 59: 212-219.
- Potrich, M., Alves, L.F.A., Mertz, N.R., Silva, E.R.L. 2006. Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *BioAssay* 01: 01-09.
- Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Santos, J.P. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39: 21-31.
- Rondelli, V.M., Carvalho, J.R., Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., De Alencar, J.R.D.C.C., Zinger, F.D., Pereira, S.M.A. 2012. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolates for controlling *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae). *Idesia* 30: 97-102.
- Rosseto, C.J. 1966. Sugestões para o armazenamento de grãos no Brasil. *O agrônomo* 18: 38-51.
- Sgarbiero, E., Trevizan, L.R.P., Baptista, G.C. 2003. Pirimipos-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* 32: 707-711.
- Zhang, Y.J., Feng, M.G., Fan, Y.H., Luo, Z.B., Yang, X.Y., Wu, D., Pei, Y. 2008. A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology* 18: 543-555.