

Isolados de fungos entomopatogênicos visando ao controle da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) Klug (Coleoptera; Cerambycidae)

Entomopathogenic fungi isolates to control the borer of yerba mate (*Hedypathes betulinus*) Klug (Coleoptera; Cerambycidae)

André Luis Pereira Fanti¹; Luis Francisco Angeli Alves^{2*}

Resumo

A erva-mate é uma cultura importante da região sul do Brasil, Argentina e Paraguai, tendo grande importância sócio-econômica e ambiental. Com a escassez de ervas nativas, a cultura da erva-mate passou a ser cultivada em sistema de monocultivo e como consequência, alguns insetos tornaram-se pragas, sendo a broca, *Hedypathes betulinus*, muito importante. A fim de incrementar o controle biológico na cultura, o objetivo deste trabalho foi avaliar em laboratório 32 isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e 18 isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.. Inicialmente, avaliaram-se os isolados imergindo adultos da broca da erva-mate em suspensão fúngica contendo 1×10^8 conídios mL^{-1} , e posteriormente os que proporcionaram maior mortalidade confirmada, foram selecionados para segunda etapa, na qual avaliou-se a virulência e crescimento vegetativo, produção de conídios em meio de cultura sintético, arroz e em cadáveres de broca. Destacaram-se três isolados de *B. bassiana* (UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 e UNIOESTE 64), e um de *M. anisopliae* (IBCB 352), atingindo mortalidade confirmada igual ou superior a 90% na primeira etapa, sendo estes selecionados para etapa posterior, juntamente com isolado padrão, CG 716. O isolado IBCB 352 de *M. anisopliae*, apesar de ser o único da espécie a ser selecionado para a segunda etapa, provocou a maior mortalidade confirmada e conidiogênese em cadáveres de broca, indicando uma elevada produção de inóculo, sendo este, o indicado para a campo.

Palavras-chave: Controle microbiano, *Ilex paraguariensis*, controle biológico

Abstract

Yerba mate is an important crop of southern Brazil, Argentina and Paraguay, with socio-economic and environmental importance. Due the lack of native herbals, yerba mate has become a monoculture, and as a consequence, insects have become pests, and the borer, *Hedypathes betulinus*, one of the most important. In order to improve biological control in the crop, this work aims to evaluate in laboratory 32 isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and 18 isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Initially, isolates virulence was evaluated by immersing the adults borers in a fungal suspension, containing 1×10^8 conidia mL^{-1} , and after, those caused highest confirmed mortality were selected for the second step, wherein it was evaluated the virulence, vegetative growth and conidia production in synthetic culture medium, rice and borer bodies. Three isolates of *B. bassiana* (UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 and UNIOESTE 64) and one of *M. anisopliae* (IBCB 352) reached confirmed mortality equal or superior to 90%, these isolates were selected for the second step, together

¹ Biólogo, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Câmpus de Cascavel, Cascavel, PR. E-mail: andre.fanti@gmail.com

² D.Sc., Prof. da UNIOESTE, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Câmpus de Cascavel, Cascavel, PR. E-mail: luis.alves@unioeste.br

* Autor para correspondência

with the standard isolated GC 716 (*B. bassiana*). The isolated IBCB 352 of *M. anisopliae*, despite being the only of this species to be selected for the second step, promoted the high confirmed mortality and conidiogenesis in adults borer, indicating a high inoculum production, being nominated for field evaluations.

Key words: Microbial control, *Ilex paraguariensis*, biological control

Introdução

Na região sul do Brasil, a erva-mate desempenha importante papel socioeconômico, principalmente nas pequenas propriedades agrícolas, onde compõe um dos sistemas de exploração agroflorestais mais antigos e característicos (BERNARDI; CALDEIRA; NASCIMENTO, 2005; RENOVATTO; AGOSTINI, 2008).

Com o avanço da agricultura moderna, tornaram-se escassos os ervais nativos, passando o sistema de exploração para monocultivo adensado. Assim, a planta é submetida a condições que diferem daquelas às quais se adaptou (IEDE, 1983; PENTEADO, 1995; PENTEADO; IEDE; LEITE, 2000), favorecendo a incidência e a intensidade de doenças, insetos e ácaros praga (CHIARADIA; MILANEZ; ZIDKO, 2002; BORGES; LÁZZARI; LÁZZARI, 2003).

A broca da erva-mate, *Hedypathes betulinus*, é a principal praga da cultura, cujas larvas são responsáveis por broquear os ramos e tronco, impedindo a circulação da seiva, resultando no depauperamento das mesmas, podendo afetar 50-60% das plantas adultas já em produção. O adulto mede aproximadamente 25 mm de comprimento e é encontrado geralmente no terço médio da planta, seu controle é basicamente feito por catação manual (PENTEADO, 1995; SOARES, 1998; GUEDES; D'AVILA; DORNELLES, 2000; D'ÁVILA; COSTA; GUEDES, 2006; LEITE, 2006).

Dada à natureza perene da erva-mate e seu porte arbóreo/arbustivo, o controle biológico natural da praga na cultura é fortemente exercido por inúmeros inimigos naturais, destacando parasitoides de ovos e de larvas, formigas predadoras de ovos, além de percevejos predadores de adultos do besouro (SOARES; IEDE, 1997; SOARES, 1998; GRAF; MARZAGÃO, 1999). Da mesma forma, Soares,

Iede e Santos (1995) relataram a ocorrência natural dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de *H. betulinus*, em erval no município de Ivaí, PR, e, segundo esses autores, esses fungos se adequadamente veiculados e aplicados, podem apresentar potencial de controle, baixo impacto ambiental e poucos resíduos no produto. Além disso, podem permanecer ativos por longos períodos no ambiente cultivado.

Apesar de já existir no mercado um produto comercial à base de fungo (AGROFIT, 2012; NOVOZYMES, 2012), a grande variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos justifica a realização de estudos de seleção de isolados, essencial para obter isolados mais eficientes, contribuindo assim para o desenvolvimento de programas de controle biológico da praga.

Material e Métodos

Avaliação de fungos entomopatogênicos

Os insetos foram obtidos em plantação comercial de erva-mate localizada em Ivaí, PR, e mantidos em gaiolas teladas, conforme Alves et al. (2009).

Foram avaliados 50 isolados de fungos, sendo 32 isolados de *Beauveria bassiana* e 18 isolados de *Metarhizium anisopliae* (Tabela 1) obtidos da coleção do Instituto Biológico e da Unioeste, e foram mantidos a -10°C , em forma de micélios e conídios. O isolado CG 716 foi utilizado como padrão por ter sido previamente selecionado para o controle da broca (LEITE; PENTEADO; OLIVEIRA, 2003). A avaliação foi constituída por duas fases, sendo a primeira, na qual todos os isolados foram avaliados contra o inseto e na segunda, os melhores isolados foram comparados entre si, em diversos parâmetros biológicos, conforme Rohde et al. (2006).

Tabela 1. Origem dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e porcentagem de mortalidade confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*).

Isolado	Hospedeiro Original ou substrato	% mortalidade confirmada
<i>B. bassiana</i>		
UNIOESTE 64	<i>Hedypathes betulinus</i>	93
CG 716	<i>H. betulinus</i>	90
UNIOESTE 52	<i>Alphitobius diaperinus</i>	90
UNIOESTE 4	<i>A. diaperinus</i>	90
UNIOESTE 60	Chrysomelidae	86
UNIOESTE 59	<i>A. diaperinus</i>	83
UNIOESTE 38	<i>Bombyx mori</i>	80
UNIOESTE 65	<i>Anthonomus grandis</i>	80
UNIOESTE 69	<i>H. betulinus</i>	80
UNIOESTE 62	<i>A. diaperinus</i>	76
UNIOESTE 49	<i>A. diaperinus</i>	73
UNIOESTE 2	<i>A. diaperinus</i>	73
IBCB 15	Solo	70
IBCB 301	Solo – Cana	70
UNIOESTE 39	<i>Cosmopolites sordidus</i>	70
UNIOESTE 53	<i>A. diaperinus</i>	70
IBCB 31	<i>Nezara viridula</i>	67
IBCB 365	Solo – Café	67
UNIOESTE 37	<i>B. mori</i>	66
UNIOESTE 56	<i>A. grandis</i>	64
UNIOESTE 46	<i>Euschistus heros</i>	63
IBCB 614	<i>Epachoplon cruciatum</i>	63
IBCB 88	<i>Leptopharsa heveae</i>	63
IBCB 527	Solo – Cana	57
IBCB 34	Solo	54
UNIOESTE 25	Solo – Erva-mate	50
IBCB 615	<i>E. cruciatum</i>	43
UNIOESTE 44	Hemíptera – Pentatomidae	42
UNIOESTE 55	<i>A. diaperinus</i>	40
UNIOESTE 45	<i>Astylus variegatus</i>	30
UNIOESTE 48	<i>A. diaperinus</i>	14
UNIOESTE 26	Solo – Erva-mate	8
<i>M. anisopliae</i>		
IBCB 352	Solo	93
IBCB 353	<i>Mahanrva fimbriolata</i>	80
IBCB 418	Lagarta (p2 5-3)	80
IBCB 417	Lagarta (p2 5-2)	73
IBCB 52	Cigarrinha	73
UNIOESTE 22	Solo – Erva-mate	73
IBCB 380	<i>M. fimbriolata</i>	70
IBCB 410	Lagarta (p1 5-3)	70
IBCB 156	Solo	68
IBCB 478	Solo	66
IBCB 545	Solo – Café	63

continua

continuação

IBCB 482	Solo	56
IBCB 167	Solo	50
IBCB 185	Solo	47
SLP 358	<i>A. grandis</i>	46
IBCB 59	Cigarrinha	45
IBCB 121	Solo	43
IBCB 383	<i>M. fimbriolata</i>	43

Fonte: Elaboração dos autores.

Avaliação dos isolados dos diferentes fungos entomopatogênicos

Os isolados foram multiplicados em meio de cultura para produção de conídios (M.E.) (ALVES; PEREIRA 1998a), em placas de Petri, incubados a 26 ± 1 °C, 14h de fotofase, por sete a 10 dias. Após este período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura, e foram armazenados a -10 °C em tubos de vidro fechados com filme de PVC transparente, por um período não superior a 15 dias.

Previamente à inoculação, os conídios foram suspensos em água destilada + Tween 80 a 0,01% dentro dos tubos de vidro e agitados em vortex por um minuto, então procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer sendo preparadas as suspensões (1×10^8 conídios mL^{-1}) (ALVES; MORAES, 1998). Em seguida, os insetos foram imersos individualmente nas suspensões por 5 segundos com agitação manual e transferidos para placas de Petri com o fundo recoberto por papel-filtro para retirar o excesso da suspensão de fungo e individualizados em copos plásticos transparente de 500 mL, contendo um ramo de erva-mate, fechados com tampa plástica perfurada.

Foram utilizados 30 insetos adultos para cada tratamento, sendo cada inseto considerado uma repetição. Na testemunha os insetos foram imersos apenas em água destilada + Tween 80 0,01%. Os insetos foram mantidos a 26 ± 1 °C e 14h de fotofase e durante 15 dias procedeu-se a avaliação diária, sendo os insetos mortos retirados, desinfestados por

imersão em solução alcoólica 70% e posteriormente em água destilada. Os mesmos foram mantidos em câmara úmida para confirmação da mortalidade por fungo, nas mesmas condições citadas. Os isolados que causaram mortalidade confirmada mínima de 90%, foram selecionados para a etapa posterior.

Comparação de Isolados: Os isolados selecionados previamente, bem como o isolado CG716, considerado padrão de comparação, foram novamente multiplicados como descrito no item anterior, para serem comparados entre si quanto à virulência e outros parâmetros biológicos, como seguem:

Virulência: Foram adotados os mesmos procedimentos descritos na primeira etapa, porém, para cada isolado foram preparadas suspensões em água destilada + Tween 80 0,01% com cinco concentrações distintas, sendo elas: 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 e 1×10^7 conídios/ mL^{-1} e para cada uma delas foram utilizados 60 insetos adultos, divididos em quatro repetições de 15 insetos cada.

Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios em Meio de Cultura: Os isolados foram inoculados na superfície do ME em placas de Petri, e incubados a 26 ± 1 °C e 14h de fotofase. Após 10 dias, as colônias foram avaliadas por meio de duas medições perpendiculares do diâmetro, determinando-se o diâmetro médio. Para cada isolado foram preparadas três placas, cada uma considerada uma repetição. Após a avaliação do crescimento vegetativo, as colônias foram recortadas do meio de cultura e individualizadas

em tubos de vidro com 10 mL de água destilada + Tween 80 a 0,01%. Os conídios foram removidos com o auxílio de um pincel passado sobre as colônias e em seguida, os tubos foram submetidos a ação de vórtex por 1 minuto para a quantificação dos conídios em câmara de Neubauer.

Produção de Conídios em Arroz e em Cadáveres de Broca da Erva-Mate: A produção de conídios em arroz foi realizada utilizando o método do Biomax® (ALVES; PEREIRA, 1998b). Para tal, sacos de polipropileno, contendo 100 g de arroz polido e pré-cozido por três minutos em água fervente, foram autoclavados por 15 min a 120 °C. Após o resfriamento, foram inoculados 5 mL de suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL⁻¹), sendo preparados três sacos para cada isolado, cada um considerado uma repetição. Os sacos foram incubados a 26 ± 1 °C e 14h de fotofase durante sete dias, quando foram abertos e seu conteúdo exposto a um fluxo de ar em bandejas de plástico, em uma câmara asséptica por quatro dias, a 25 ± 1 °C e 24h de fotofase. Em seguida, fez-se a quantificação de conídios, individualizando 1 g de cada repetição em tubos de vidro de fundo chato com 10 mL de água destilada + Tween 80 a 0,01%, contando-os em câmara de Neubauer.

Para estimar a produção de conídios em cadáveres de broca, para cada um dos isolados, foram selecionados 12 adultos mortos e que apresentavam o corpo recoberto por conídios, que foram individualizados em tubos de vidro de fundo chato com 10 mL de água destilada e Tween 80 a 0,01%. Em seguida, os conídios da superfície dos insetos foram removidos com auxílio de pincel, a suspensão foi agitada em vórtex durante um minuto e quantificada em câmara de Neubauer.

Análise estatística: Os dados obtidos em cada um dos experimentos foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e análise de homogeneidade pelo teste de Bartlett, sendo posteriormente realizada análise de variância (teste F) e as médias comparadas entre si pelo

teste de Tukey ($P < 0,05$), segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). Os dados obtidos na etapa virulência foram submetidos à análise de Probit para estimar a concentração letal que mata 50% da população (CL_{50}), utilizando o programa Polo Plus.

Resultados e Discussão

Avaliação de Patogenicidade dos Fungos: De modo geral, os insetos foram suscetíveis aos fungos, e apesar de vários isolados causarem elevado potencial na mortalidade dos insetos, optou-se por selecionar, além do isolado padrão CG 716, os isolados UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 e UNIOESTE 64 de *B. bassiana*, que apresentaram mortalidade confirmada igual ou superior a 90%. Para os isolados de *M. anisopliae*, a mortalidade confirmada variou entre 43 e 93%, no entanto, apenas o isolado IBCB 352, que causou 93% de mortalidade confirmada foi selecionado, pois foi o único a atingir os mesmos índices de mortalidade dos isolados de *B. bassiana*.

Ambas as espécies de fungos, mostraram-se patogênicas ao inseto, confirmando os resultados obtidos por Pagliosa, Santos e Diodato (1994) e Leite (2006), que apesar de utilizarem outros isolados, obtiveram resultados semelhantes com os aqui apresentados, onde os isolados de *B. bassiana* variaram de 8 a 93% e os isolados de *M. anisopliae* variaram de 43 a 93%.

Contudo, a superioridade da espécie *B. bassiana* é confirmada por outros estudos em que se observa também o destaque de *B. bassiana* no controle de insetos (ANDALÓ et al., 2004; ROHDE et al., 2006; PEREAULT; WHALON; ALSTON, 2009; ALVES; NEVES; FARIA, 2010). Esta superioridade na diversidade de hospedeiros em que *Beauveria* é associado pode ser explicada pela sua capacidade de produzir uma grande variedade de proteínas e metabólitos secundários envolvidos na patogênese e na virulência. Além disso, também possui maior

número de genes que expressam toxinas semelhantes às de bactérias, assumindo maior toxicidade oral, bem como maior quantidade de proteases (XIAO et al., 2012).

Virulência: Os dados obtidos não se ajustaram ao modelo Probit, porque os bioensaios nem sempre

seguiram o modelo do tipo estímulo-resposta (HADDAD, 1998), diante disso, optou-se pela comparação da porcentagem média da mortalidade total e confirmada de adultos da broca, após 15 dias da inoculação (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média de mortalidade total e confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) (26 ± 1 °C, fotofase: 14h), 15 dias após o tratamento.

Isolados	Concentração de conídios/mL				
	Mortalidade total				
	1×10^7	5×10^6	1×10^6	5×10^5	1×10^5
UNIOESTE 4(Bb)	83±1,0Aa	67±1,4Aab	58±3,9Ab	73±2,4Aab	57±2,2Ab
UNIOESTE 52(Bb)	80±3,3Aa	77±2,9Aa	48±3,9Ab	68±2,8ABab	58±2,5Aab
UNIOESTE 64(Bb)	70±2,1Aa	62±2,1Aa	58±2,1Aa	52±4,4ABa	50±3,2Aa
CG 716(Bb)	80±3,0Aa	70±3,5Aa	75±3,7Aa	63±4,4ABa	55±4,4 Aa
IBCB 352(Ma)	73±1,4Aa	68±1,6Aa	58±2,8Aab	40±2,7Bb	40±2,4Ab
Mortalidade Confirmada					
UNIOESTE 4(Bb)	36±1,0Ba	35±0,8Ba	20±1,3Ab	20±1,3BCb	7±0Ac
UNIOESTE 52(Bb)	43±2,1Bab	53±0Aa	21±2,8Ac	33±0Abc	20±1,3Ac
UNIOESTE 64(Bb)	38±0,8Ba	33±0Bab	30±1,7Ab	13±0Cc	7±0Ac
CG 716(Bb)	43±1,6Ba	35±0,8Bb	25±0,8Ac	20±0BCc	7±0Ad
IBCB 352(Ma)	63±1,6Aa	53±4,0Aab	30±3,7Abc	25±1,6Bc	11±2,5Ac

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

Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, separados por mortalidade total e confirmada, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Elaboração dos autores.

Para mortalidade total, quando analisado por concentrações, a única diferença estatística entre os isolados foi observada na concentração de 5×10^5 conídios mL^{-1} , cujo isolado IBCB 352 foi menos eficiente que os demais.

Para o isolado UNIOESTE 4, a concentração mais elevada (1×10^7 conídios mL^{-1}) obteve a maior mortalidade total (83,3%), não diferindo concentrações 5×10^6 e 5×10^5 conídios mL^{-1} . O isolado UNIOESTE 52, apresentou diferença estatística apenas na concentração 1×10^6 conídios mL^{-1} , sendo esta a que causou menor mortalidade (48,3%). Já os isolados UNIOESTE 64 e CG 716, não apresentaram diferença estatística entre as concentrações utilizadas. Já o isolado de *M.*

anisopliae IBCB 352, não apresentou diferença estatística nas três concentrações mais elevadas (73,3; 68,3 e 58,3% respectivamente), sendo estas superiores às demais.

Em relação à mortalidade confirmada, quando analisado por concentrações, o isolado de *M. anisopliae* (IBCB 352), causou a maior mortalidade na concentração mais alta (1×10^7 conídios mL^{-1}) com 62,7%, diferindo estatisticamente das demais. Já na concentração 5×10^6 conídios/ mL^{-1} , este isolado não diferiu estatisticamente do isolado UNIOESTE 52, e ambos diferiram dos demais. Nas concentrações 1×10^6 e 1×10^5 , todos os isolados não diferiram entre si, mas na concentração 5×10^5 o isolado UNIOESTE 52 foi superior, diferindo dos demais.

O isolado UNIOESTE 4 foi mais eficiente nas concentrações mais elevadas, (1×10^7 e 5×10^6 conídios/mL⁻¹), diferindo das demais. Para o isolado UNIOESTE 52, a concentração que atingiu maior confirmação da mortalidade, foi a de 5×10^6 conídios/mL⁻¹, com 52,8%, porém não diferindo estatisticamente da concentração mais elevada. Para o isolado UNIOESTE 64, as duas concentrações mais elevadas também foram mais eficientes, não diferindo entre si e para o isolado CG 716, a concentração mais elevada (1×10^7 conídios mL⁻¹) foi mais eficiente (42,9%), e diferiu de todas as outras.

O isolado de *M. anisopliae*, IBCB 352 obteve a maior porcentagem de confirmação (62,7%), sendo esta obtida na concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹, não diferindo apenas da concentração 5×10^6 conídios mL⁻¹ (52,8%).(Tabela 2).

Verificou-se também que os valores de mortalidade confirmada foram inferiores aos da mortalidade total, sendo que para alguns isolados não se observou conidiogênese sobre os cadáveres (Tabela 2).

Ainda que a mortalidade seja de fato o principal objetivo a ser alcançado com a aplicação de um fungo entomopatogênico, a capacidade de produção de conídios sobre os cadáveres é um fator desejável e importante, pois esses constituem fonte de inóculo para disseminação do fungo no campo (ALVES, 1998; NEVES; HIROSE, 2005).

Diferenças entre a porcentagem de mortalidade total e a confirmada também foram verificadas por Padulla e Alves (2009), Villacarlos, Mejia e Keller (2003), Loureiro et al. (2005) e Barboza et al. (2011) para insetos de diferentes ordens e, especificamente também por Shimazu (1994), que estudando a infecção de *Monochamus alternatus* (Colep.: Cerambycidae) por *B. bassiana* afirmou que a falta de conidiogênese sobre os cadáveres é comum, apesar da infecção e morte do inseto ser decorrente do fungo.

Considerando que o fungo pode causar a morte do hospedeiro diretamente pela ação de micotoxinas,

ou de forma indireta pela exaustão de nutrientes, quebras fisiológicas/bioquímicas e também pelo bloqueio mecânico do aparelho digestório, devido ao crescimento vegetativo, entre outros danos físicos (HAJEK; ST. LEGER, 1994; ALVES, 1998). Esses são aspectos importantes e que devem ser considerados na interpretação dos resultados, já que a morte do inseto pode ocorrer antes da colonização total do cadáver, dificultando a sua conidiogênese.

Da mesma forma, a penetração do fungo no tegumento do inseto provoca uma abertura que pode facilitar a entrada de outros micro-organismos, os quais devido ao desenvolvimento mais rápido colonizam o hospedeiro e impedem a esporulação do fungo (NEVES; ALVES, 2000; PADULLA; ALVES, 2009).

Além disso, é importante salientar que para a ocorrência da doença é necessário uma condição ótima dos fatores bióticos e abióticos e que estudos de laboratório dificilmente conseguem reproduzir as condições microclimáticas da cultura e, além disso, cada espécie ou isolado pode ser influenciada de modo diferente perante esses fatores, exigindo outras condições para seu desenvolvimento (ALVES, 1998).

Além das características relacionadas aos fungos ou mesmo ao ambiente, há ainda, àquelas associadas à natureza do hospedeiro, incluindo presença de compostos antifúngicos no exoesqueleto, a eficiência da defesa celular que pode levar à encapsulação do fungo nos tecidos do hospedeiro (CHOUVENC; SU; ROBERT, 2009; GOŁEBIOWSKI et al., 2012).

Além disso, segundo Alves e Pereira (1998a), alguns fungos são incapazes de penetrar no inseto através do sistema digestório, mas podem causar danos independentemente da posterior colonização do hospedeiro, pela liberação de toxinas no sistema digestório dos insetos, resultando na morte do mesmo pela ação de toxinas, sem o crescimento do fungo. Assim, de acordo com a metodologia utilizada, imergindo o inseto numa suspensão

fungica, é possível também considerar este aspecto na compreensão dos resultados obtidos.

Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios em Meio de Cultura. Observou-se que os isolados de *B. bassiana* obtiveram diâmetro médio de colônia muito próximo entre si (3,0 cm e 3,3 cm), já o isolado IBCB 352 (*M. anisopliae*) obteve 2,70cm de diâmetro médio.

Em relação aos isolados de *B. bassiana*, estes valores são superiores aos obtidos por Thomazoni (2009), que nesse mesmo parâmetro avaliou o crescimento dentre outros isolados, o isolados UNIOESTE 64 de *B. bassiana*, cujo diâmetro médio de colonias foi de 2,8. No entanto, inferiores aos obtidos por Rohde et al. (2006), que realizando esse teste com os isolados de *B. bassiana* obteve 3,8 cm de diâmetro médio de colônia para o isolado UNIOESTE 4. Porém, foram inferiores aos obtidos por Potrich et al. (2010), cujas colônias de outros

isolados de *B. bassiana* variaram de 3,4 a 4,5 cm, porém, após oito dias de incubação.

Em relação ao fungo *M. anisopliae*, os resultados aqui apresentados para o crescimento vegetativo são inferiores aos de Rohde et al. (2006), que obtiveram 3,8 cm para o isolado IBCB 320, mas próximos aos de Alexandre et al. (2006), obtiveram média de 2,5 e 3,4 cm no diâmetro das colônias para os isolados de *M. anisopliae* UEL50 e CB116, respectivamente.

Quanto à produção de conídios colônia⁻¹, o isolado UNIOESTE 64 foi superior aos demais (10,4×10⁷ conídios colônia⁻¹), mas não diferiu estatisticamente do isolado CG 716 (8,9×10⁷ conídios colônia⁻¹), e em relação a produção média de conídios cm⁻² o isolado UNIOESTE 64 também se destaca (1,5×10⁷ conídios cm⁻²), mas não diferindo estatisticamente dos isolados CG 716 (0,98×10⁷ conídios cm⁻²) e IBCB 352 (0,81×10⁷ conídios cm⁻²) (Tabela 3).

Tabela 3. Diâmetro médio de colônias e produção de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) em meio-de-cultura (M.E.), 10 dias após inoculação (26 ± 1°C, fotofase: 14h).

Isolados	Diâmetro médio das colônias (cm)	Produção de conídios/colônia (n × 10 ⁷)	Produção média de conídios/cm ² (n × 10 ⁷)
UNIOESTE 4(Bb)	3,1±0,02 a	5,1±0,19 bc	0,6±0,02 b
UNIOESTE 52(Bb)	3,0±0,01 ab	1,94±0,07 d	0,3±0,01 c
UNIOESTE 64(Bb)	3,3±0,04 a	10,4±0,43 a	1,2±0,05 a
CG 716(Bb)	3,3±0,02 a	8,9±0,42 ab	1,0±0,05 ab
IBCB 352(Ma)	2,7±0,05 b	4,7±0,18 c	0,8±0,07 ab
C.V. (%)	4,40	22,04	19,96

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

Médias(±EP) seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Fonte: Elaboração dos autores.

Os resultados diferem dos alcançados por Thomazoni (2009), com o isolado UNIOESTE 64, cuja produção de conídios por colônia foi de 1,8×10⁸ conídios colônia⁻¹. Também contrasta do obtido por Rohde et al. (2006) que como isolado UNIOESTE 4 alcançaram 33,5×10⁸ conídios colônia⁻¹.

Ressalta-se ainda, que Potrich et al. (2010) observaram uma relação positiva dos fungos, entre o diâmetro médio das colônias e a produção média de conídios colônia⁻¹, pois ainda segundo os autores, as variações entre isolados da mesma espécie podem ser ocasionadas pelo fotoperíodo, temperatura, umidade relativa, assim como o tipo e espessura

do meio de cultura e da genética dos isolados que podem variar dentro da mesma espécie e também dentro do mesmo isolado.

Produção de Conídios em Arroz e em Cadáveres de Broca da Erva-Mate: Os isolados UNIOESTE 64 e CG 716 de *B. bassiana* obtiveram maior produtividade de conídios g⁻¹ de arroz (23,3×10⁷ e 26,6×10⁷, respectivamente) e foram superiores aos outros isolados da mesma espécie, no entanto, não diferiram estatisticamente do

isolado IBCB 352 de *M. anisopliae*, que obteve 17,6×10⁷ conídios g⁻¹ de arroz (Tabela 4). No entanto, os resultados são inferiores aos obtidos por Rohde et al. (2006), que para o mesmo isolado UNIOESTE 4, foi obtida produção de 8,3×10⁸ conídios g⁻¹ de arroz, logo, comparando os resultados com Thomazoni (2009), o isolado UNIOESTE 64 obteve melhores resultados do que o encontrado pelo autor (1,2×10⁸ conídios g⁻¹ de arroz).

Tabela 4. Produção de conídios de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) em arroz e cadáveres de *Hedypathes betulinus*.

Isolados	Número de conídios g de arroz ⁻¹ (n×10 ⁷)	Número de conídios cadáver ⁻¹ (n×10 ⁷)
UNIOESTE 4(Bb)	5,90±0,32 b	0,29±0,02 b
UNIOESTE 52(Bb)	9,30±1,80 b	3,75±0,85 b
UNIOESTE 64(Bb)	23,3±1,30 a	0,36±0,02 b
CG 716(Bb)	26,6±2,14 a	0,69±0,11 b
IBCB 352(Ma)	17,6±0,56 ab	27,9±1,51 a
C.V. (%)	37,01	64,42

Dados originais apresentados; para análise estatística os dados foram transformados em arcsen ($\sqrt{x/100}$). Médias (±EP) seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P< 0,05).

Fonte: Elaboração dos autores.

Contudo, Zappellini et al. (2010) obtiveram quantidade média de 2,52 e 2,46 × 10⁹ conídios g⁻¹ dos isolados de *M. anisopliae* IBCB 417 e 481, respectivamente, muito superiores do aqui apresentado pelo isolado IBCB 352 (17,6×10⁷ conídios g⁻¹). Mesmo sendo os isolados da mesma espécie, esta diferença pode estar relacionada a fatores que envolvem o método de produção empregado, assim 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, a qualidade e quantidade do inóculo empregado, são essenciais para a boa produção, além disso, a variabilidade genética dos isolados de fungos pode proporcionar um melhor ou pior aproveitamento dos nutrientes disponíveis em determinado meio de cultura, provocando

assim, diferença na produção dos fungos (ALVES 1998; JABOR et al., 2003; SANTORO et al., 2007; POTRICH et al., 2010).

Já na produção de conídios em cadáveres de broca, o isolado de *M. anisopliae* IBCB 352 destacou-se com produção média de 27,9×10⁷ conídios cadáver⁻¹, superior aos demais. Porém, entre os isolados de *B. bassiana*, destacou-se o UNIOESTE 52 com 3,75×10⁷ conídios cadáver⁻¹, no entanto, não diferiu estatisticamente dos demais isolados desta espécie (Tabela 4). Este parâmetro é de grande importância quando se trata de aplicações futuras em campo, pois um isolado que apresenta um elevado potencial de inóculo, tem maior probabilidade de manter-se presente no campo, causando epizootia (ALVES; LECUONA, 1998).

O isolado IBCB 352 foi o único pertencente ao gênero *M. anisopliae* nesta segunda etapa e destacou-se na mortalidade confirmada (63% na concentração 1×10^7 conídios mL⁻¹) e conidiogênese em cadáveres de broca ($27,9 \times 10^7$ conídios cadáver⁻¹), sendo este, juntamente com o isolado UNIOESTE 52 de *B. bassiana*, que atingiu 53% de mortalidade confirmada na concentração 5×10^6 conídios/mL e produziu $3,75 \times 10^7$ conídios cadáver⁻¹, os indicados para avaliação do desempenho do patógeno em campo, devido à objetividade prática do trabalho e por indicarem um elevado potencial de inóculo.

Referências

- AGROFIT – SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação- Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. 2012. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 out. 2012.
- 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*, Londrina, v. 35, n. 1, p. 75-82, 2006.
- ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. J. O.; FARIA, M. R. *Recomendações para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas*. Piracicaba: Fundag, 2010. 52 p.
- ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. Epizootia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 5, p. 97-163.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 20, p. 637-710.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 11, p. 289-370.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 11, p. 289-370.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatogênicos. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998a. cap. 2, p. 39-52.
- _____. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998b. cap. 27, p. 845-867.
- ALVES, V. S.; ALVES, L. F. A.; QUADROS, J. C.; LEITE, L. G. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematóide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 479-482, 2009.
- ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2004.
- BARBOZA, M. R.; SILVA, D. N.; LUSTOSA, S. B. C.; HIROSE, E. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). *Ambiência*, Guarapuava, v. 7, n. 3, p. 473-480, 2011.
- BERNARDI, E.; CALDEIRA, M. F.; NASCIMENTO, J. S. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 489-493, 2005.
- BORGES, L. R.; LÁZZARI, S. M. N.; LÁZZARI, F. A. Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto à ocorrência e flutuação populacional de insetos. *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, PR, v. 47, n. 4, p. 563-568, 2003.
- CHIARADIA, L. A.; MILANEZ, J. M.; ZIDKO, A. Estimativa das gerações anuais de *Gyropsylla spgazziniana* (LIZER, 1917) em função de sua exigência térmica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 385-391, 2002.
- CHOUVENC, T., SU, N. Y.; ROBERT, A. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, Davie, v. 101, n. 3, p. 234-241, 2009.
- D'ÁVILA, M.; COSTA, E. C.; GUEDES, J. V. C. Bioecologia e Manejo da broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 16, n. 2, p. 233-241, 2006.

- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GOLEBIEWSKI, M.; BOGUS, M. I.; PASZKIEWICZ, M.; WIELOCH, W.; WŁOKA, E.; STEPNOWSKI, P. The Composition of the cuticular and internal free fatty acids and alcohols from *Lucilia sericata* males and females. *Lipids*, Gdańsk, Poland, v. 47, n. 6, p. 613-622, 2012.
- GRAF, V.; MARZAGÃO, M. R. Ocorrência de parasitóide *Labena fiorii* sp.n. (Hymenoptera, Ichneumonidae) em larvas de *Hedypathes betulinus* (Klug), broca da erva-mate e em *Chydarteres striatus* (Fabricius), broca da aroeira, (Coleoptera, Cerambycidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 185-190, 1999.
- GUEDES, J. V. C.; D'AVILA, M.; DORNELLES, S. H. B. Comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate em campo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 6, p. 1059-1061, 2000.
- HADDAD, M. L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 34. p. 999-1034.
- HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review Entomology*, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 293-322, 1994.
- IEDE, E. T. Considerações sobre a entomofauna da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS – SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.), 1983, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Embrapa/CNPF, 1983. p. 64-75.
- JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; RODRIGUES, S. B.; MARQUES-SILVA, G. G.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2003.
- LEITE, M. S. P.; IEDE, E. T.; PENTEADO, S. do R. C.; ZALESKI, S. R. M.; CAMARGO, J. M. M.; RIBEIRO, R. D. Eficiência de fungos entomopatogênicos no controle de *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae), em laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21., 2006, Recife. *Resumos...* Recife: Sociedade Entomológica do Brasil, 2006. Resumo 1165-1.
- LEITE, M. S. P.; PENTEADO, S. R. C.; OLIVEIRA, S. de. Eficiência do fungo *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. no controle de *Hedypathes betulinus* (KLUG, 1825) (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE), em campo. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. *Anais...* Chapecó: EPAGRI, 2003. s.5-9. 1 CD-ROM.
- LOUREIRO, E. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 34, n. 5, p. 791-798, 2005.
- NEVES, P. 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*, Londrina, v. 34, n. 1, p. 77-82, 2005.
- NEVES, P. J.; ALVES, S. B. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 43, n. 4, p. 373-378, 2000.
- NOVOZYMES. Produtos biológicos: PRODUCTS & SOLUTIONS. 2012. Disponível em: <http://www.bioag.novozymes.com/en/products/brazil/Documents/2011-21576-01_PS_BoveMax%20BR.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2012.
- PADULLA, L. F. L.; ALVES, S. B. Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungos entomopatogênicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 297-302, 2009.
- PAGLIOSA, M. M. R.; SANTOS, H. R.; DIOTATO, M. A. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL., em *Hedypathes betulinus* (KLUG, 1825), praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Agrárias*, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 225-228, 1994.
- PENTEADO, S. R. C. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para o seu controle. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. *Erva mate: biologia e cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p. 109-120.
- PENTEADO, S. R. C.; IEDE, E. T.; LEITE, M. S. P. Pragas da erva-mate: perspectivas de controle. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE ENCANTADO-RS, 3., 2000, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 27-37.
- PEREAULT, R. J.; WHALON, M. E.; ALSTON, D. G. Field efficacy of entomopathogenic fungi and nematodes targeting caged last-instar plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Michigan cherry and apple orchards. *Environmental Entomology*, State College, v. 38, n. 1, p. 1126-1134, 2009.

- POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; MERTZ, N. R.; BONINI, A. K.; SILVA, E. R. L.; MARCHESI, L. P. C. Seleção e associação de cultivares de milho com *Beauveria bassiana* para o controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 5-18, jan./mar. 2010.
- RENOVATTO, Y. P.; AGOSTINI, J. Qualidade microbiológica e físico-química de amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) comercializadas em Dourados, MS. *Interbio*, Dourados, v. 2, n. 2, p. 12-20, 2008.
- ROHDE, C.; ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B.; SILVA, E. R. L.; ALMEIDA, J. E. M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.
- SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J.; ALEXANDRE, T. M.; ALVES, L. F. A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 4, p. 483-489, 2007.
- SHIMAZU, M. Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology*, Inashiki, v. 29, n. 1, p. 127-130, 1994.
- SOARES, C. M. S. *Flutuação populacional, aspectos comportamentais e levantamento de inimigos naturais de Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), em um povoamento puro de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SOARES, C. M. S.; IEDE, E. T. Perspectivas para o controle da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) Coleoptera: Cerambycidae. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Ed. dos Organizadores, 1997. p. 391-400.
- SOARES, C. M. S.; IEDE, E. T.; SANTOS, H. R. Ocorrência natural dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Hedypathes betulinus* (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE). In: SICONBIOL, SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1995, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, [s.n], 1995. p. 81. (Sessão de posters).
- THOMAZONI, D. *Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos visando o controle da lagarta-do-cartuchodo-milho Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). 2009. Monografia (Graduação – Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.
- VILLACARLOS, L. T.; MEJIA, B. S.; KELLER, S. *Entomophthora leyteensis* Villacarlos & Keller sp. nov. (Entomophthorales: Zygomycetes) infecting *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance) (Insecta, Hemiptera: Aleyrodidae), a recently introduced whitefly on *Gliricidia sepium* (Jac.) Walp. (Fabaceae) in the Philippines. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 83, n. 1, p. 16-22, 2003.
- XIAO, G.; YING, S. H.; ZHENG, P.; WANG, Z. L.; ZHANG, S.; XIE, X. Q.; SHANG, Y.; ST LEGER, R. J.; ZHAO, G. P.; WANG, C.; FENG, M. G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, Londres, v. 2, n. 483, p. 1-10, 2012.
- ZAPPELINI, L. O.; ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; GIOMETTI, F. H. C. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 75-82, 2010.