

Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. spores production in biphasic process utilizing different liquid media

Patricia Helena Santoro¹; Pedro Manuel de Oliveira Janeiro Neves^{2*};
Roberta Zani da Silva³; Silvia Akimi⁴; Janaína Zorzetti⁵

Resumo

Técnicas de produção de fungos entomopatogênicos são desenvolvidas buscando aumentar a produtividade desses patógenos e reduzir custos do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biomassa de *Beauveria bassiana* em meios líquidos e a conidiogênese no processo bifásico. Os meios líquidos testados foram: FC (farinha de crisálida), BD (batata+dextrose) e FCBD (farinha de crisálida+batata+dextrose). Os períodos de avaliação da produção de biomassa foram: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 hs. Para a produção pelo processo bifásico, diferentes quantidades dos meios líquidos (5, 10, 15 e 20 mL) com diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 hs), foram adicionadas sobre arroz pré-cozido (200 g), avaliando-se a produção de conídios após 10 dias. Na produção de biomassa, o meio FCBD foi o mais produtivo durante todos os períodos avaliados. No processo bifásico, as maiores produções de conídios foram atingidas quando utilizou-se como inóculo do arroz, biomassa fúngica produzida nos meios FC e FCBD ($2,7 \times 10^{12}$ e $2,8 \times 10^{12}$ conídios/g de arroz). As quantidades de 5, 15 e 20 mL de meio líquido, inoculadas sobre arroz, não diferiram estatisticamente. Os tempos de incubação de 24 e 48 hs, do fungo em meio líquido, proporcionaram maior conidiogênese do que em 72 hs. Os dados mostram a necessidade de fontes de carbono e nitrogênio na produção de biomassa em meio líquido e na conidiogênese em meio sólido. Também, é possível otimizar o processo bifásico, adicionando sobre o arroz (200 g) 5 mL do meio líquido FCBD com 24 hs de incubação.

Palavras-chave: Agricultura sustentável, produção orgânica, biotecnologia

Abstract

Entomopathogenic production techniques are developed with the objective of increasing productivity and reducing costs of the process. The objective of this study was to evaluate *Beauveria bassiana* biomass production in liquid media and conidiogenesis in a biphasic process. The liquid media were: CF (crysalyd flour), PD (potato dextrose) and CFPD (crysalyd flour+potato+dextrose). The evaluation periods for biomass production were: 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours. For production by biphasic process different quantities of liquid media (5, 10, 15 and 20 mL) with different incubation periods (24, 48 and 72 hours), were added on the pre-cooked rice (200 g) with conidia production evaluation after 10 days.

¹ Eng^a Agr^a, aluna do curso de Mestrado em Agronomia, do Depto de Agronomia, CCA/Uel – Email: patysantoro@zipmail.com.br

² Prof. Dr. Universidade Estadual de Londrina (UEL), Depto. de Agronomia, Cx. Postal 6001, 86001-970, Londrina PR.

³ Eng^a Agr^a, Mestre em Agronomia, aluna de Doutorado do Depto de agronomia, CCA/Uel

⁴ Aluna do Curso de Biologia da Faculdade Estadual de Filosofia Ciências e Letras de Cornélio Procópio.

⁵ Aluna do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina; bolsista do PIBIC/CNPq

* Autor para correspondência.

CFPD media was the most productive biomass in all evaluated periods. In the biphasic process, bigger conidia production were attained when it was utilized fungi biomass produced in CF and CFPD (2.7×10^{12} and 2.8×10^{12} conidia/g of rice) for rice inoculation. The quantities of 5, 15, 20 mL of liquid media, inoculated on the rice were not statistically different. The incubation periods of 24 and 48 hours of the fungus in the liquid media, gave bigger conidiogenesis then 72 hours. The data show the necessity of carbon and nitrogen for biomass production in the liquid media and for conidiogenesis in the solid media. Also with these informations it was possible to optimize the biphasic process, adding 5 mL of the liquid media CFPD on the rice (200 g) with 24 hours of incubation.

Key words: Sustainable agriculture, organic production, biotechnology

Introdução

Com a seleção de insetos resistentes, ressurgência de pragas e problemas de contaminação ambiental e humana, novos estudos são desenvolvidos visando formas alternativas ao controle químico dos insetos. Entre elas, destaca-se o controle biológico através da utilização de inimigos naturais como predadores, parasitóides ou entomopatógenos.

O controle biológico, com entomopatógenos, é denominado controle microbiano, e inclui como agentes os vírus, os fungos, as bactérias, os nematóides e os protozoários. O impacto de epizootias naturais, causadas em particular por patógenos fúngicos e virais sobre a população de pragas, demonstra o potencial do controle microbiano (CHARNLEY, 1997). Das doenças que ocorrem em insetos, aproximadamente 80% tem como agentes etiológicos os fungos. A ocorrência desses patógenos, em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, tem sido um fator importante na redução das populações de pragas (ALVES, 1998a).

Em um programa de manejo integrado de pragas, os fungos entomopatogênicos podem se tornar um importante componente da estratégia de controle (BARRERA et al., 1990). Para serem utilizados como inseticidas biológicos, precisam estar disponíveis em grandes quantidades, pois os insetos normalmente necessitam de um elevado potencial de inóculo para serem colonizados por esses patógenos (ALVES, 1998b). Com isso torna-se necessária a produção de fungos em larga escala, através de processos “*in vitro*”, que são basicamente três: meios sólidos, líquidos e bifásico (líquidos-sólidos).

Para se obter sucesso na produção comercial e no uso de fungos para o controle de pragas, alguns aspectos devem ser levados em consideração, como: seleção de um isolado que apresente rápido crescimento, abundante esporulação e elevada patogenicidade para a praga alvo; desenvolvimento de um meio de simples composição, com baixo custo e viável em larga escala. Além disto, os componentes do meio devem ser minimamente processados e de fácil e rápida procedência (SAMSINAKOVA et al., 1981).

Os meios líquidos têm sido cada vez mais utilizados, pois permitem melhor controle das condições físicas e nutricionais exigidas pelo organismo (JACKSON, 1997). Já a produção de fungos no processo bifásico, combina o benefício da alta produção de biomassa obtida pelo cultivo submerso em meio líquido, com a produção de conídios estáveis e hidrofóbicos em meio sólido em menor espaço de tempo, utilizando-se em larga escala, produtos naturais de baixo custo, principalmente o arroz (LEITE et al., 2003).

A espécie *Beauveria bassiana*, por ser patogênica a várias espécies de insetos e de fácil produção *in vitro*, é um dos fungos mais utilizados para controlar pragas na agricultura. Este trabalho teve como objetivos avaliar o desenvolvimento de *B. bassiana* em diferentes meios líquidos, utilizando como fontes nutricionais produtos de baixo custo e fácil aquisição e avaliar a produção de conídios em arroz através de um processo bifásico.

Material e Métodos

Reativação do isolado e obtenção do inóculo

O isolado de *B. bassiana* utilizado foi o CG432, armazenado no banco de entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Estadual de Londrina, Londrina PR. Adultos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* FERRARI (COLEOPTERA: SCOLYLIDAE), criados em laboratório, foram inoculados com *B. bassiana* para reativar as características originas. Após a esporulação sobre os cadáveres dos insetos, o fungo foi isolado em meio BDA (batata-dextrose-agar) para obtenção dos conídios e posterior utilização como fonte de inóculo para os meios líquidos.

Substrato utilizado

Na preparação dos meios líquidos utilizou-se como fonte de nitrogênio a farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), que é um subproduto da indústria de seda, e como fonte de carbono utilizou-se batata e dextrose. Segundo Neves (1991), o teor de proteína bruta encontrado em farinha de crisálida é de 55,47 % e Mestres et al. (1996), verificaram que a porcentagem de amilose em batata é de 18 a 20%. Os meios testados foram: FC (Farinha de crisálida 200g), BD (Batata 200g e Dextrose 20g) e FCBD (Farinha de crisálida 100g, Batata 100g e Dextrose 10g).

1º Bioensaio: Meios Líquidos

Para o meio FC a farinha de crisálida foi fervida em 1 litro de água destilada por 5 minutos. No meio BD a batata descascada e fatiada foi fervida em 1 litro de água destilada até cozimento, separando-se em seguida o caldo, ao qual adicionou-se a dextrose. O meio FCBD foi obtido através da mistura dos meios FC e BD em proporções iguais.

Os meios foram filtrados a vácuo em funil de Büchner e papel filtro, dividindo o conteúdo líquido em garrafas de vidro (320 mL), contendo 100 mL de

meio cada, autoclavado-se por 30 minutos, a 120°C sob pressão de 1 atm. Após resfriamento, as garrafas foram inoculadas com 1mL da suspensão de conídios de *B. bassiana*, que foram padronizadas em 1×10^8 conídios/ml, fechadas com papel toalha e colocadas em incubadora refrigerada (Tecnal TE-421) com agitação a 110 rpm e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sem luminosidade.

Para avaliação da produção de biomassa, nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, foram retiradas da incubadora 5 repetições (garrafas) de cada um dos diferentes meios. As amostras foram filtradas a vácuo em funil de Büchner e papel de filtro, separando-se a biomassa produzida do conteúdo líquido. Os papéis de filtro, onde ficou retida a biomassa, foram colocados em placas de Petri e levados a estufa (60°C) para secagem até atingir peso constante. As amostras foram pesadas em balança analítica para determinação de biomassa produzida, subtraindo-se o peso do papel. A variação de peso seco de biomassa foi obtida através da diferença da média do peso do período atual de avaliação com a média do peso do período anterior, determinando-se a taxa de crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 3×7 (meios \times tempos). Os dados foram submetidos à análise de variância complementada pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2º Bioensaio: Meio Sólido

Na segunda fase do experimento avaliou-se a produção de conídios no processo bifásico, onde cada meio líquido (FC, BD e FCBD), em diferentes quantidades (5, 10, 15 e 20 mL) e diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas) foram inoculados sobre 200g de arroz pré-cozido e autoclavado em sacos de polipropileno. Após a inoculação, os sacos de arroz foram fechados e mantidos em sala climatizada a temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Após 3 dias os sacos foram abertos e

permaneceram na sala por mais 7 dias para completa conidiogênese, quando então foi retirado de cada saco uma amostra de 1g de arroz com conídios, para quantificação, em câmara de Neubauer. Cada tratamento foi constituído de 4 repetições (sacos). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 3 x 3 x 4 (meios x quantidades de inóculo x tempos). Os dados foram submetidos à análise de variância complementada pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

A biomassa produzida pelo fungo *B. bassiana* no meio FCBD foi superior aos demais meios e crescente durante todo o período de avaliação (Tabela 1). Esses dados confirmam a necessidade de fontes de carbono e nitrogênio em um meio de

cultura para que ocorra o bom desenvolvimento do fungo, como descrito por Soper e Ward (1981). Smith e Grula (1981), observaram que fontes de carbono podem iniciar a germinação de *B. bassiana*, porém fontes de nitrogênio são necessárias para o crescimento micelial. Bidochka, Pfeifer e Kahachatourians (1987) verificaram que a reserva de nitrogênio presente no interior do conídio é insuficiente para favorecer o crescimento micelial.

A produção máxima de biomassa para o meio FC foi verificada em 72 hs de incubação, com 3,3 g/L de peso seco de biomassa. Para o meio BD, a produção máxima ocorreu com 96 hs de incubação com 3,2 g/L. O meio FCBD, teve produção crescente durante todo período de avaliação, com produção máxima em 168 hs, com 5,6 g/L, no entanto, após 72 hs de incubação, sua produção (3,7 g/L) foi superior as máximas obtidas pelos demais meios (Tabela 1).

Tabela 1: Produção de biomassa (g/L) de *Beauveria bassiana* em diferentes meios líquidos e diferentes períodos de incubação. FC (farinha de crisálida), BD (batata+dextrose) e FCBD (farinha de crisálida+batata+dextrose).

MEIOS	PERÍODOS DE INCUBAÇÃO (hs)						
	24	48	72	96	120	144	168
FC	0,16±0,10 Ad	2,12±0,16 Bc	3,30±0,14 Ba	3,10±0,18 Ba	2,54±0,20 Bb	2,28±0,09 Bc	2,16±0,10 Bc
BD	0,20±0,00 Ae	1,40±0,12 Cd	2,80±0,14 Cb	3,16±0,17 Ba	2,16±0,13 Cc	2,12±0,13 Bc	2,08±0,15 Bc
FCBD	0,30±0,00 Ag	2,66±0,10 Af	3,73±0,13 Ae	4,44±0,17 Ad	5,00±0,22 Ac	5,38±0,04 Ab	5,64±0,05 Aa

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

Rombach (1988) verificou que meios constituídos de maltose (4%), de sacarose (3,5%) e de extrato de levedura (2,5%), todos acrescentados de diversos sais básicos (KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) obtiveram rendimento de peso seco de biomassa variando entre 9 a 12,3 g/L. Apesar de apresentar uma produção de biomassa superior aos meios FC, BD e FCBD os meios utilizados por Rombach (1988) são economicamente inviáveis em produções em larga escala, as quais, segundo

Samsinokova et al. (1981) devem utilizar na composição de meios, produtos minimamente processados.

Nahas e Arai (1987), buscando obter melhores condições de crescimento de *B. bassiana*, testaram meios semi-sintéticos de Sabouraud, Tedders, Czaperk e Pontecorvo e meios naturais constituídos por farelo de soja, farelo de trigo, farelo de arroz e farinha de crisálida. O meio Pontecorvo propiciou o mais rápido crescimento. Porém, os meios naturais (exceto o de farelo de soja) superaram o crescimento apresentado pelos demais meios semi-sintéticos.

A maior taxa de crescimento para os meios FC e FCBD ocorreu entre 24-48 hs de incubação, que foi 59,4% e 41,8% respectivamente. Para o meio BD a maior taxa foi de 44,3% entre 48-72 hs. A taxa de crescimento tornou-se negativa para os meios FC após o intervalo de 72-96 hs, e para o meio BD após 96-120 hs (Figura 1). Através destes dados é possível

estabelecer um tempo ideal de incubação para produção de biomassa nos meios líquidos testados, que é entre 72 e 96 hs após a inoculação. Acima deste período o processo pode se tornar economicamente inviável, aumentando os custos de produção com os gastos de energia elétrica, espaço, mão-de-obra e maior risco de contaminação.

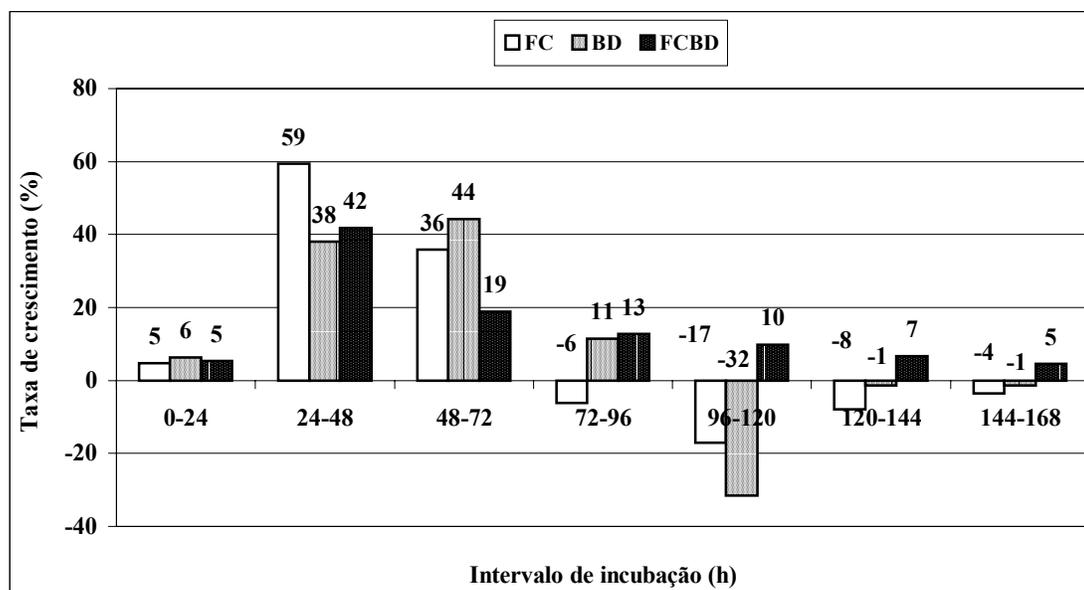


Figura 1. Taxa de crescimento (%) de *Beauveria bassiana* em diferentes meios líquidos nos diferentes intervalos de incubação. FC (farinha de crisálida), BD (batata+dextrose) e FCBD (farinha de crisálida+batata+dextrose).

Dentro do processo bifásico, foi possível verificar que as maiores produções de conídios foram atingidas quando se adicionou ao arroz micélio produzido nos meios FC e FCBD com $2,8 \times 10^{12}$ e $2,7 \times 10^{12}$ conídios/g (Tabela 2). Através desses resultados, é possível afirmar que a fonte nutricional utilizada na preparação do meio líquido influencia a produção de conídios no processo bifásico, e que meios contendo fontes de nitrogênio proporcionam maior produtividade de conídios quando inoculados sobre o arroz, o qual é basicamente fonte de carboidrato.

Tabela 2. Produção de conídios ($\times 10^{12}$) de *Beauveria bassiana* no processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos: FC (farinha de crisálida), BD (batata+dextrose) e FCBD (farinha de crisálida+batata+dextrose).

Meios	Conídios/g	
FC	$2,8 \pm 0,14$	A
BD	$2,3 \pm 0,11$	B
FCBD	$2,7 \pm 0,12$	A

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

O fator quantidade de meio líquido, inoculada no arroz não influenciou a produção de conídios que foi de $2,6 \times 10^{12}$, $2,7 \times 10^{12}$ e $2,8 \times 10^{12}$ conídios/g de arroz respectivamente para 5, 15 e 20 mL de meio líquido (Tabela 3). Este dado mostra que a quantidade de micélio existente em 5 mL é suficiente para a inoculação de 200 g, sendo desnecessário a utilização de uma quantidade maior, a qual poderá estar sendo utilizada na inoculação de mais arroz. Quanto à influência dos tempos de incubação dos meios líquidos, na produção de conídios em arroz, observa-se que 24 e 48 horas proporcionaram maior produtividade, a qual foi de $2,8 \times 10^{12}$ de conídios/g, já em 72 horas a produção foi de $2,3 \times 10^{12}$ de conídios/g (Tabela 4). Com os resultados obtidos é possível otimizar o processo bifásico adicionando sobre o arroz (200 g) 5 mL do meio líquido FCBD, com 24 horas de incubação, assim ocorrerá diminuição dos custos e do tempo de produção.

Tabela 3. Produção de conídios ($\times 10^{12}$) de *Beauveria bassiana* no processo bifásico inoculando-se o meio sólido (arroz) com diferentes quantidades de meio líquido.

Quantidade	Conídios/g	
5 mL	$2,59 \pm 0,16$	A
10 mL	$2,32 \pm 0,16$	B
15 mL	$2,72 \pm 0,13$	A
20 mL	$2,79 \pm 0,13$	A

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

Tabela 4. Produção de conídios ($\times 10^{12}$) de *Beauveria bassiana* no processo bifásico inoculando-se o meio sólido (arroz) com meio líquido incubado por diferentes tempos.

Tempo	Conídios/g	
24 hs	$2,77 \pm 0,13$	A
48 hs	$2,76 \pm 0,13$	A
72 hs	$2,27 \pm 0,11$	B

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

Alguns trabalhos, onde a produção é feita apenas em meio sólido, a produtividade de conídios de *B. bassiana* em arroz tem atingido valores menores, com maior tempo de incubação. LONDONO et al. (1992) obteve uma produção média de $7,7 \times 10^9$ de conídios/g de arroz em 20 dias e Vilas Boas et al. (1996), observou produção máxima de $2,7 \times 10^{10}$ de conídios/g de arroz em 30 dias. Comparando-se esses resultados com a produtividade obtida no processo bifásico utilizando os meios líquidos FC, BD e FCBD ($2,3$ a $2,8 \times 10^{12}$ de conídios/g de arroz entre 11 e 13 dias) é possível afirmar que, esses meios líquidos, quando adicionados sobre o arroz, aceleram o tempo de produção e aumentam a produtividade entre 100 e 1000 vezes.

Os resultados aqui observados permitem concluir que, a produção de conídios pelo processo bifásico utilizando o meio líquido FCBD tem um elevado potencial em processos de produção massal de *B. bassiana*. Também, observou-se que o menor tempo de incubação (24 hs) e a menor quantidade de meio líquido (5 mL) adicionado ao meio sólido propiciaram boas produções de conídios otimizando o processo e diminuindo os custos pela maior produtividade. Além dos aspectos relativos a produção, outros como a qualidade dos propágulos e sua virulência em relação ao hospedeiro podem estar diretamente relacionados aos nutrientes fornecidos ao patógeno durante sua produção (LEITE et al., 2003). Desta forma, num programa específico de produção é importante considerar este aspecto através de bioensaios com o inseto hospedeiro.

Referências

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998a. p.289-381
- ALVES, S.B. Produção de fungos entomopatogênicos. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998b. p.854-871

- BARRERA, J.F.; MOORE, D.; ABRAHAM, Y.J.; MURPHY, S.T.; PRIOR, C. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* in México and possibilities for further action. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE ON PESTS AND DISEASES, 2., 1990, Silwood Park, U.K. *Proceedings...* Silwood Park, U.K: BCPC, 1990. p.391-396.
- BIDOCHKA, M.J.; PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*, Den Haag, v.99, n.2, p.77-83, Aug. 1987.
- CHARLEY, A.K. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: ESSER K.; LEMKE, P.A. (Ed.). *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p.185-218.
- JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Hampshire, v.19, p.180-187, 1997.
- LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Piracicaba- SP: ESALQ, 2003.
- LONDONO, O.P.A.; FLOREZ, F.J.P.; PARDEY, A.E.B.; GARCIA, M.T.G. Produccion en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Cenicafé: Avances Tecnicos*, Colômbia., n.182, p.11, 1992.
- MESTRES, C.; MATENCIO, F.; PONS, B.; YAJID, M.; FLIEDEL, G. A rapid Method for the determination of Amylose content by using differential scanning calorimetry, *Starch*, Weinheim, v.48, p.2-6, 1996.
- NAHAS, E.; ARAI, N.N.S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.18, n.1, p.77-82, jan./mar. 1987.
- NEVES, P.M.O.J. *Produção de Nomuraea rileyi (FARLOW) SAMSON e Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Utilizando meios de cultura à base de farinha de crisálida do bicho-da-seda Bombyx mori L. 1758*. 1991. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- ROMBACH, M.C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympoduloconidia in liquid culture. *Entomophaga*, Paris, v.33, n.3, p.315-324, 1988.
- SAMSINAKOVA, A.; KALALOVA, S.; VLCEK, V.; KYBAL, J. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v.38, p.169-174, 1981.
- SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v.37, n.3, p.222-230, 1981
- SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAVIDAS, G.C. (Ed.). *Biological control in crop production*. New York: Allanheld & Osmun Publ, 1981. p.161-180,.
- VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v.39, n.1, p.123-128, 1996.