**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise integrada das variáveis virulência e produção de conídios na seleção
de fungos entomopatogênicos para o desenvolvimento de biopesticidas**

Giovani Marcio Coura Junior

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2017**

Giovani Marcio Coura Junior
Tecnólogo em Gestão Ambiental

Análise integrada das variáveis virulência e produção de conídios na seleção de fungos entomopatogênicos para o desenvolvimento de biopesticidas

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JUNIOR**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências: Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Coura Junior, Giovani Marcio

Análise integrada das variáveis virulência e produção de conídios na seleção de fungos entomopatogênicos para o desenvolvimento de biopesticidas / Giovani Marcio Coura Junior. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

74 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Fungos entomopatogênicos 2. Seleção de isolados 3. Biopesticidas 4. Controle microbiano I. Título

A DEUS,

*Pelo milagre diário concedido de poder abrir os olhos, levantar
e buscar meus objetivos com saúde, força e fé.*

AGRADEÇO

Aos meus pais Giovani M. Coura e Leila M. J. R. Coura,

Ao meu irmão Samuel R. Coura,

Ao meu Avô Sebastião Ribeiro e Iluina Coura (in memorian),

À toda minha Família,

Pelas orações, apoio e incentivo.

DEDICO

À minha namorada Taís Cristina Castilho,

Pelo incondicional amor, paciência, incentivo e companheirismo.

OFEREÇO

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que me concedeu o dom da vida. Por guiar meus passos e por me proporcionar a realização deste trabalho;

À minha família, pelas orações, apoio e incentivo, em especial aos meus pais Giovani M. Coura e Leila M. J. R. Coura. Serei eternamente grato por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de qualificação;

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Jr., pela orientação, paciência e confiança para a realização deste trabalho;

À bióloga e amiga Solange A. Vieira Barros, pelos ensinamentos, paciência e colaboração para o desenvolvimento desse trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pelo convívio, paciência, colaboração e conhecimentos compartilhados, em especial aos estagiários

Lucas e Rodrigo;

Aos professores e servidores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos e colaboração;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial à Andreísa e Fernanda, por toda ajuda e momentos de descontração;

Ao pesquisador Gabriel M. Mascarin e ao Filipe Couto, pela contribuição com as análises estatísticas;

Ao pesquisador André L. Lourenção do Instituto Agrônomo (IAC), por ceder os insetos para a manutenção da criação;

Aos amigos Giuliano Pauli, Vanessa S. Duarte, Vitor H. Beloti, Luiz H. Costa Mota, Marcos R. Conseschi, Gabriel R. Rugno, Ana Beatriz. R. Zanardo, Thiago Castro, Livia Porto, Marcio Alves e Rafael Alves, por todo apoio, incentivo e momentos de descontração compartilhados;

Ao Giuliano Pauli, através da FMC do Brasil, pelo financiamento de parte do projeto;

Ao Prof. e amigo Fernando Sujimoto pela ajuda com o abstract;

À Eliana pela revisão das normas de elaboração da dissertação;

A todos que direta ou indiretamente de alguma forma contribuíram para que mais esta etapa fosse concluída.

Sei muito bem do projeto que tenho em relação a vós. É um projeto de felicidade, não de sofrimento: dar-vos um futuro, uma esperança! Quando me invocardes, ireis em frente, quando orardes a mim, eu vos ouvirei. Quando me procurardes, vós me encontrareis, quando me seguirdes de todo coração, eu me deixarei encontrar por vós – oráculo do SENHOR.

“Jeremias 29, 11-14”

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTAS DE FIGURAS	11
LISTAS DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Objetivos específicos.....	16
1.2. Hipóteses	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Importância de <i>Metarhizium</i> spp. e <i>Beauveria</i> spp. no controle biológico de pragas ...	19
2.2. Desenvolvimento de Micopesticidas	21
2.2.1. Seleção de isolados para o desenvolvimento de micopesticidas	21
2.2.2. Produção massal e formulação de fungos entomopatogênicos	24
2.3. Métodos de seleção de isolados.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Criação e manutenção de <i>Tenebrio Molitor</i>	29
3.2. Criação e manutenção de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)	30
3.3. Coleta de <i>Mahanarva fimbriolata</i>	30
3.4. Origem e identificação dos Isolados.....	30
3.5. Teste de rendimento produtivo em arroz	32
3.6. Bioensaio utilizando <i>Tenebrio molitor</i> como inseto modelo	32
3.7. <i>Screening</i> inicial com concentração única de <i>Metarhizium anisopliae</i> em ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i>	33
3.8. Virulência de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> a ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i>	34
3.9. <i>Screening</i> inicial com concentração única de <i>Beauveria bassiana</i> em ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> Biótipo B	34
3.10. Virulência de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> a ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> Biótipo B	36
3.11. Análises Estatísticas	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Resultados.....	39
4.1.1. Seleção de isolados em meio de cultura	39
4.1.2. Teste de rendimento produtivo em arroz	39
4.1.3. Bioensaio utilizando <i>Tenebrio molitor</i> como inseto modelo	44

4.1.4. <i>Screening</i> inicial com concentração única de <i>Metarhizium anisopliae</i> em ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i>	46
4.1.5. Análise de cluster para os isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
4.1.6. Virulência de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> a ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i>	49
4.1.7. <i>Screening</i> inicial com concentração única de <i>Beauveria bassiana</i> em ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> Biótipo B	52
4.1.8. Análise de cluster para os isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	53
4.1.9. Virulência de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> a ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> Biótipo B	54
4.2. Discussão	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	69

RESUMO

Análise integrada das variáveis virulência e produção de conídios na seleção de fungos entomopatogênicos para o desenvolvimento de biopesticidas

Os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* e *Beauveria* compreendem um importante grupo de patógenos de artrópodes-praga. A seleção de isolados de fungos promissores é a primeira e uma das mais importantes etapas no desenvolvimento de um biopesticida, pois alguns isolados podem apresentar alta virulência e não necessariamente boa produção em substrato e vice-versa, sendo interessante a combinação desses dois parâmetros para a viabilidade comercial de um produto. A dificuldade de criação ou manutenção de algumas espécies de pragas em laboratório é um limitante para a condução de testes de virulência, tornando-se interessante a utilização de espécies modelo, de fácil criação, nas etapas preliminares de seleção. Nesse sentido, este estudo objetivou selecionar isolados com alta produção de conídios e virulência, comparando a eficiência de controle de *M. anisopliae* e *B. bassiana* às pragas alvo *Mahanarva fimbriolata* e *Bemisia tabaci* Biótipo B, respectivamente, com a mortalidade em *Tenebrio molitor*. Inicialmente, foram selecionados 50 isolados a partir de 100 isolados de cada gênero, baseado em avaliações visuais do crescimento e esporulação em meio de cultivo em placas de Petri. Estes isolados selecionados foram cultivados em arroz parboilizado para quantificação do rendimento produtivo de conídios. Os 25 isolados mais produtivos de cada espécie de fungo foram utilizados nos bioensaios com *T. molitor*. Posteriormente, os cinco isolados que causaram maior e menor mortalidade de cada gênero, foram utilizados nos bioensaios com as respectivas pragas-alvo. A variação no rendimento de conídios de *Beauveria* spp., foi de 0,3 a $7,7 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ e de *Metarhizium* spp. foi de 0,1 a $2,5 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹. A mortalidade confirmada de larvas de *T. molitor* por *Beauveria* spp., variou de 5,5 a 96,4% e por *M. anisopliae* variou de 29,1 a 89,1%. Alguns isolados causaram mortalidade elevada tanto no inseto modelo quanto na praga-alvo, porém, não foi verificada uma relação entre a virulência para as duas espécies. Da mesma forma, não foi observada associação entre os parâmetros produção de conídios e virulência. O isolado ESALQ 4958 de *B. bassiana* se destacou nos dois bioensaios apresentando mortalidades elevadas de ninfas de *B. tabaci* Biótipo B. Nos bioensaios utilizando ninfas de *M. fimbriolata*, ESALQ 1641 foi o isolado que apresentou os maiores percentuais de mortalidade nos dois bioensaios. Analisando conjuntamente as variáveis produção de conídios e virulência a *T. molitor* e a espécie alvo, os isolados ESALQ 540 (*B. bassiana*) e ESALQ 1116 (*M. anisopliae*) se destacaram por apresentarem valores elevados para todas as variáveis de interesse. Os resultados reforçam a necessidade de uma análise conjunta destas variáveis com um peso diferenciado para cada variável na seleção de isolados para utilização em produtos microbianos para o controle de pragas.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Seleção de isolados; Biopesticidas; Controle microbiano

ABSTRACT

Integrated analysis of the variables virulence and conidia production in selection of entomopathogenic fungi for the development of biopesticides

The genus *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. are important entomopathogenic fungi used to control arthropod pests. The selection of promising fungal isolates is the first and one of the most important steps on the development of a biopesticide, since some isolates may present high virulence and not necessarily good production in substrate and vice-versa, being the combination of these two parameters important for the commercial viability. Difficulties of rearing or maintaining some species of pests in laboratory are limitations for the conduction of virulence tests, justifying the use of easy to breed model species on the preliminary steps of selection. Therefore, this study aimed to select isolates with high conidia production and virulence, comparing the control efficiency of *M. anisopliae* and *B. bassiana* to the target pests, *Mahanarva fimbriolata* and *Bemisia tabaci* biotype B, respectively, with mortality in *Tenebrio molitor*. At first, 50 isolates were selected from 100 isolates of each genus, based on growth and sporulation in culture medium on Petri dishes. These isolates were grown in parboiled rice to quantify the yield of conidia. The 25 most productive isolates of each fungus species were used in the bioassays with *T. molitor*. After, the five isolates that caused higher and lower mortality of each genus were used in the bioassays with the respective target pests. *Beauveria* spp. conidia yield ranged from 0.3 to 7.7 x 10⁹ conidia.grams of rice⁻¹ and *Metarhizium* spp. from 0.1 to 2.5 x 10⁹ conidia.gram of rice⁻¹. The confirmed mortality of *T. molitor* larvae by *Beauveria* spp. varied from 5.5 to 96.4% and *M. anisopliae* varied from 29.1 to 89.1%. Some isolates caused high mortality in both, model insect and the target pest; however, no relationship between the virulence of both species was observed. Similarly, there was no association between the parameters conidia production and virulence. The *B. bassiana* isolate ESALQ 4958 in both bioassays presented high mortalities of *B. tabaci* Biotype B. In bioassays using *M. fimbriolata* nymphs, ESALQ 1641 was the isolate that presented the highest mortalities in both bioassays. Analyzing the variables, conidia production and virulence to *T. molitor* and the target species, the isolates ESALQ 540 (*B. bassiana*) and ESALQ 1116 (*M. anisopliae*) showed high values for all variables of interest. The results reinforce the necessity of a joint analysis of these variables with different weight for each one in the selection of isolates, aiming to use them in microbial products for pest control.

Keywords: Entomopathogenic fungi; Selection of isolates; Biopesticides; Microbial control

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema simplificado das etapas desenvolvidas para a seleção de isolados promissores para o desenvolvimento de um micoinseticida.29
- Figura 2. A. Vista do experimento sobre a eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Mahanarva fimbriolata* em plantas de cana-de-açúcar em copos descartáveis e B. Ninfas de *Mahanarva fimbriolata* aderidas às raízes de cana-de-açúcar; seta indicando ninfa esporulada por *M. anisopliae*.34
- Figura 3. A. Vista do experimento sobre a eficiência de *Beauveria bassiana* a ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B em plantas de soja cultivadas em tubos do tipo Falcon (50mL). B. Ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B; seta indicando ninfa infectada por *B. bassiana*.36
- Figura 4. Rendimento de conídios.grama de arroz-1 (média e intervalo de confiança) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. produzidos via fermentação sólida e agrupados em três grupos (A, B e C) pelo teste de médias de Scott-Knott, considerando um nível de 5% de significância.41
- Figura 5. Rendimento de conídios.grama de arroz-1 (média e intervalo de confiança) de diferentes isolados de *Beauveria* spp. produzidos via fermentação sólida e agrupados pelo teste de médias de Scott-Knott, considerando um nível de 5% de significância.43
- Figura 6. Dendrograma formado por dez isolados de *Metarhizium anisopliae*; retângulos vermelhos indicam a formação de três grupos distintos considerando quatro variáveis respostas. As semelhanças entre os tratamentos são indicadas por valores de AU em vermelho e os retângulos vermelhos em torno de clusters são fortemente suportados por dados com AU P-valores > 0,90 (Bootstrap reamostragem = 1000 repetições).49
- Figura 7. Sobrevivência de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* a $26,5 \pm 2^\circ \text{C}$, $80 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase 10 dias após a aplicação dos tratamentos (A) ESALQ 1641, (B) ESALQ 1037, (C) ESALQ 1184 e (D) ESALQ 1204 em diferentes concentrações. Letras vermelhas na frente das linhas indicam diferença entre os tratamentos [Log Rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$]. 51
- Figura 8. Mortalidade confirmada de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* a $26,5 \pm 2^\circ \text{C}$, $80 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase 10 dias após a aplicação de diferentes isolados de *Metarhizium* spp.52
- Figura 9. Dendrograma formado por dez isolados de *Beauveria bassiana*, retângulos vermelhos indicam a formação de dois grupos distintos considerando quatro variáveis respostas. As semelhanças entre os tratamentos são indicadas por valores de AU em vermelho e os retângulos vermelhos em torno de clusters são fortemente suportados por dados com AU P-valores > 0,90 (Bootstrap reamostragem = 1000 repetições).54

Figura 10. Sobrevivência de ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B à $26,5 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 10\%$ e 12h de fotofase após 7 dias da aplicação dos tratamentos (A) ESALQ 543, (B) ESALQ 604, (C) ESALQ 4958 e (D) ESALQ 447 em diferentes concentrações. Letras vermelhas na frente das linhas indicam diferença entre os tratamentos [Log Rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$]. 56

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL ₅₀), Intervalo de confiança (IC) e teste Log Rank (Mantel-Cox) de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após a aplicação de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.....	45
Tabela 2. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> (IC) após a aplicação de diferentes isolados de <i>Beauveria</i> spp.	46
Tabela 3. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança (IC) de ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i> após a aplicação de diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
Tabela 4. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança (IC) de ninfas de <i>Mahanarva fimbriolata</i> após a aplicação de diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
Tabela 5. Mortalidade confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança (IC) de ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> Biótipo B após aplicação de diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	53
Tabela 6. Parâmetros do modelo log-normal (Probit) e estimativas das concentrações letais medianas (CL ₅₀) e intervalo de confiança (IC) para quatro isolados de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados em ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> Biotipo B	55

1. INTRODUÇÃO

A utilização de estratégias biológicas que visam manter populações-praga abaixo do nível de dano econômico tem apresentado um crescimento considerável nos últimos anos em função das exigências por métodos de produção agrícola menos impactante ao meio ambiente e à saúde pública.

Dentre as táticas do manejo integrado de pragas, os fungos entomopatogênicos apresentam uma série de vantagens como a efetividade contra um amplo espectro de hospedeiros, capacidade de infectar diferentes estágios de desenvolvimento, transmissão horizontal, não são tóxicos ao homem e outros animais, não poluem o meio ambiente e ainda podem ser formulados e pulverizados juntamente com inseticidas seletivos, por maquinários agrícolas convencionais (ALVES, 1998a).

Os atributos apresentados por esses patógenos de insetos contribuíram para a intensificação do número de pesquisas envolvendo fungos entomopatogênicos, o que resultou em mais de 160 registros de micoinseticidas de várias espécies de fungos em todo o mundo desde a década de 60 (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Metarhizium spp. e *Beauveria* spp. são os patógenos mais estudados por apresentarem vantagens como a facilidade e alto rendimento produtivo em meios artificiais. Contudo, a grande variabilidade genética encontrada entre as espécies desses microrganismos exige a execução de estudos apropriados para selecionar isolados com as características necessárias para a utilização em programas de controle microbiano (ALVES, 1998b). As características mais importantes são a alta virulência e alta produção em substrato de crescimento.

A maioria dos estudos que envolvem fungos entomopatogênicos abordam principalmente a mortalidade aos organismos estudados e em alguns casos a produção em arroz. A dificuldade de manutenção de criações em laboratórios para algumas espécies, como é o caso da cigarrina das raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) inviabiliza a realização dos testes de virulência. Desse modo, a adoção de espécies modelo que são facilmente criadas em laboratório torna-se interessante por permitir um “screening” mais refinado e pela possibilidade de comparar a virulência para um grande número de isolados. Entretanto, o uso de espécies modelo ainda precisa ser validado.

Além da virulência e a produção massal econômica de propágulos infecciosos, a seleção de isolados deve ainda considerar os efeitos abióticos que atuam fortemente na

inativação e consequentemente resultam no insucesso de controle pelo patógeno. Assim, o processo de identificação de isolados promissores para o desenvolvimento de um produto a base de fungos entomopatogênicos deve considerar conjuntamente os parâmetros de produção de propágulos, virulência, resistência às condições adversas do ambiente, bem como apresentar considerável tempo de prateleira após formulação e compatibilidade com as tecnologias de aplicação. Nesse sentido, objetivou-se com esse estudo selecionar isolados com alta produção de conídios em fermentação sólida e posteriormente identificar dentre os mais produtivos, isolados virulentos às pragas-alvo *M. fimbriolata* para *Metarhizium* spp. e *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) Biótipo B para *Beauveria* spp.

1.1. Objetivos específicos

- Selecionar isolados de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. com maior rendimento de conídios produzidos em fermentação sólida (arroz);
- Correlacionar a produção de conídios de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. com a mortalidade causada ao inseto modelo *Tenebrio molitor* (Fabricius, 1798) (Coleoptera, Tenebrionidae);
- Avaliar a eficiência de isolados de *M. anisopliae* para o controle de *M. fimbriolata*;
- Avaliar a eficiência de isolados de *B. bassiana* para o controle de *B. tabaci* Biótipo B;
- Comparar a mortalidade obtida em *T. molitor* com a eficiência de controle de *M. anisopliae* e *B. bassiana* às pragas alvo *M. fimbriolata* e *B. tabaci* Biótipo B, respectivamente.

1.2. Hipóteses

- Existe uma correlação negativa entre os parâmetros produção de conídios e virulência, sugerindo a necessidade de uma análise que leve em consideração o peso destas variáveis na seleção de isolados para utilização em produtos microbianos para o controle de pragas;
- Existe uma correlação entre a mortalidade causada por isolados fúngicos ao inseto modelo *T. molitor* e a insetos-pragas, permitindo que um screening inicial para seleção de isolados seja

feito em *T. molitor*, um inseto facilmente criado em laboratório, para somente numa segunda etapa selecionar os melhores isolados aos insetos alvo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. no controle biológico de pragas

O controle biológico é um importante componente do manejo integrado de pragas. Dentre as estratégias disponíveis, os fungos entomopatogênicos representam uma importante ferramenta que pode ser utilizada visando a manutenção de artrópodes-praga abaixo do nível de dano econômico.

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados no controle microbiano. Estão distribuídos dentro de 90 gêneros com mais de 700 espécies, sendo que dessas, mais de 20 foram registradas comercialmente para o controle de pragas de importância econômica (ALVES, 1998b).

Os primeiros estudos que demonstraram a eficiência de fungos para o controle de pragas ocorreram no ano de 1835, por Agostino Bassi, que conseguiu reproduzir em laboratório a infecção causada por *B. bassiana* sobre o bicho-da-seda, *Bombyx mori*, a qual chamou de “muscardine branca” (LORD, 2005). O gênero *Metarhizium* foi primeiramente descrito por Metschnikoff em 1879, como *Entomophthora anisopliae* e posteriormente transferido para o novo gênero *Metarhizium* por Sorokin em 1883, o qual ficou conhecido como “muscardine verde”(ZIMMERMANN, 2007a).

No Brasil, o primeiro relato da incidência desses patógenos sobre insetos é datado de 1923, quando Pestana descreveu a ocorrência de *M. anisopliae* sobre uma espécie de cigarrinha, tendo primeiramente feito referência a esse fungo como *Penicillium anisopliae* (ALVES, 1992). No entanto, os estudos envolvendo fungos entomopatogênicos foram intensificados a partir do ano de 1964, quando foi registrada a ocorrência epizootica de *M. anisopliae* sobre a cigarrinha das folhas da cana-de-açúcar, *M. posticata* (Stal, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) (ALVES et al., 2008a) .

De acordo com Scholte et al. (2004), os estudos relacionados a fungos entomopatogênicos estão voltados principalmente para os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, devido a sua comprovada eficiência e a fácil produção em diferentes substratos.

Dentro do gênero *Metarhizium*, a espécie *M. anisopliae* é a mais utilizada. Acredita-se que esse patógeno é capaz de infectar mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens, incluindo pragas de importância agrícola e vetores de doenças humanas (ALVES, 1998b).

No Brasil, *M. anisopliae* é utilizado exclusivamente por sua ação inseticida, como ingrediente ativo de 18 produtos que estão disponíveis em diferentes tipos de formulações, visando o controle principalmente de espécies de cercopídeos (MAPA/Agrofit, 2016). O uso inundativo de *M. anisopliae* tem sido adotado como estratégia que integra o programa mais eficiente de controle biológico do país e que também está entre os melhores programas do mundo, para o controle de uma das principais pragas da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), *M. fimbriolata* (PARRA, 2014).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana e dos subprodutos açúcar e álcool. A área total do cultivo de cana-de-açúcar destinada a atividade sucroalcooleira que deverá ser colhida na safra 2016/2017 é de 9.110,9 mil hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016). Segundo Parra (2014), a utilização de *M. anisopliae* para o controle da cigarrinha-das-raízes chegam a cobrir uma área de 2 milhões de hectares. Além disso, é esperado um aumento na adoção desse microrganismo devido a proibição da queima da palhada que antecede o corte da cultura. O acúmulo da palha tem favorecido o desenvolvimento de algumas espécies, principalmente da cigarrinha-da-raiz, *M. fimbriolata*, que tem se tornado um sério problema para algumas regiões produtoras (BATISTA FILHO et al., 2003). O tratamento químico é de difícil implementação pelo fato do crescimento adensado da cultura dificultar a ação dos produtos sobre as ninfas que se desenvolvem na raiz da planta, sob a palhada (REZENDE, 2014). Entretanto, essa condição cria um microclima favorável a ocorrência de epizootias e permanência do fungo no campo. Além disso, a pressão por parte dos órgãos ambientais pela utilização de métodos de controle alternativos aos químicos tem impulsionado a utilização do controle biológico nesta cultura.

Além da potencial ação inseticida, novas abordagens vêm sendo estudada para utilização de *Metarhizium spp.*, explorando-se também a capacidade desses microrganismos em auxiliar na aquisição de nutrientes, por associação endofítica com raízes (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012), no crescimento de plantas (SASAN; BIDOCHKA, 2012) e na prevenção de doenças por antagonismo a patógenos (SASAN; BIDOCHKA, 2013).

Para o gênero *Beauveria*, a espécie *B. bassiana* é a mais estudada, sendo encontrada naturalmente infectando insetos, em amostras de solo e colonizando plantas endofiticamente. Há relatos da ação patogênica desse microrganismo em mais de 700 espécies de hospedeiros, incluindo insetos e ácaros (INGLIS et al., 2001; ZIMMERMANN, 2007b; MASCARIN; JARONSKI, 2016).

No Brasil, *B. bassiana* é indicada principalmente para o controle de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836), *Dalbulus maidis* (Delong e Wolcott, 1923), *Cosmopolites sordidus*

(Germar, 1924), *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867), *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908), *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) e *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal, 1833) (MAPA/Agrofit, 2016). A eficiência dessa espécie no controle de *B. tabaci* Biótipo B também tem sido relatada em pesquisas recentes (MASCARIN et al., 2013).

Bemisia tabaci Biótipo B é considerada atualmente uma das principais pragas da agricultura nacional, com perdas econômicas estimadas em 714 milhões de dólares em culturas como soja, feijão, algodão e espécies vegetais (OLIVEIRA et al., 2013). Como agravante, devido a sua plasticidade genética, seu controle convencional utilizando inseticidas químicos induz ao rápido desenvolvimento de resistência aos diferentes grupos químicos (LOURENÇÃO et al., 2015). Além disso, os efeitos colaterais para organismos não-alvo e os riscos ambientais causados pela utilização de produtos químicos têm estimulado a adoção de estratégias biológicas para o controle dessa espécie.

Nove produtos de *B. bassiana* encontram-se registrados no país, sendo que destes, oito estão disponíveis na formulação do tipo pó molhável (WP) e apenas um produto encontra-se disponível na formulação do tipo concentrado emulsionável (EC), sendo indicados principalmente para *B. tabaci* Biotipo B (MAPA/Agrofit, 2016). Assim como para as espécies de *Metarhizium*, algumas pesquisas têm relatado que os benefícios observados pela utilização de espécies de *Beauveria* vão além da ação inseticida, relacionando alguns metabólitos secundários à interação endofítica, com efeitos de deterrência alimentar ou antibiose para algumas espécies de herbívoros (VEGA, 2008).

2.2. Desenvolvimento de Micopesticidas

2.2.1. Seleção de isolados para o desenvolvimento de micopesticidas

A obtenção de bons resultados através do controle biológico é grandemente dependente do quão bem o processo de seleção do organismo é realizado. (FRAVEL, 2005). Em sua maioria, os fungos entomopatogênicos são pertencentes a duas ordens, Entomophthorales e Hypocreales. Dentro dessas divisões, todas as espécies representantes produzem estruturas que são infectivas aos seus hospedeiros, com capacidade de adesão e penetração à cutícula do inseto. Dentro do inseto, os fungos se reproduzem explorando todo o recurso interno, ocasionando a morte de seus hospedeiro e produzindo novas estruturas para infecções imediata ou de persistência no ambiente (ROY et al., 2006). No entanto, as

pesquisas para o desenvolvimento de micopesticidas são direcionadas principalmente aos gêneros da ordem Hypocreales, devido a já consolidada metodologia de produção em meios artificiais (FARIA; WRIGHT, 2001, 2007; MICHEREFF FILHO et al., 2009). As espécies da ordem Hypocreales possuem tanto a forma sexuada (teleomórfica) quanto assexuada (anamórfica) de reprodução, sendo os estudos dirigidos em sua grande maioria para a forma anamórfica (HESKETH et al., 2010). Os fungos Hypocreales em sua forma anamórfica são patógenos generalistas que infectam uma ampla gama de hospedeiros e possuem características patogênicas e saprofíticas (BLACKWELL, 2010).

Os fungos entomopatogênicos anamórficos apresentam um modo de ação por contato, nesse sentido, os propágulos infecciosos devem ser pulverizados diretamente sobre o organismo alvo, ou mesmo, serem adquiridos secundariamente através da movimentação desses organismos sobre superfícies infectadas por propágulos (FARIA; WRIGHT, 2001). Entretanto, a simples presença de uma determinada estrutura do patógeno sobre um inseto ou dentro dele não é determinante para a ocorrência da doença (ALVES; LECUNA, 1998).

Fatores bióticos e abióticos influenciam fortemente a capacidade do isolado em causar altos níveis de infecção em condições de campo (LOPES et al., 2011). Um bom conhecimento dos fatores que podem afetar a eficiência desses microrganismos, podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para atenuar tais efeitos e otimizar o impacto do microrganismo em populações de insetos-praga (INGLIS et al., 2001).

Referente aos microrganismos, a variabilidade genética existente é muito grande. Características-chave como virulência e persistência no ambiente podem ser expressados de diferentes formas para microrganismos de uma mesma espécie (GOETTEL; ELIENBERG; GLARE, 2010). Nesse sentido, estudos de seleção de isolados são essenciais para o desenvolvimento de uma formulação que seja altamente efetiva em condições de campo.

O primeiro passo para selecionar isolados com potencial comercial deve ser a avaliação da capacidade de produção em massa de propágulos de forma econômica, mantendo as características de eficácia durante a formulação e armazenamento (JACKSON, 1997). Nessas etapas, o processo deve ainda considerar a seleção de linhagens que possam expressar sua infectividade, que é a capacidade de penetração no hospedeiro, a patogenicidade que é a capacidade do microrganismo em provocar a doença e a virulência que corresponde a agressividade que a doença é causada (ALVES, LECUNA, 1998; SHAPIRO-ILAN et al., 2005; VEGA et al., 2009), além da compatibilidade com as tecnologias de aplicação e persistência no ambiente. Contudo, o processo de seleção não deve ser baseado apenas no desempenho em um ensaio biológico otimizado, as condições ambientais e o comportamento

do inseto também são fatores que influenciam a eficiência do patógeno. Assim, testes que reproduzam as condições similares em que o patógeno será utilizado permitirá selecionar isolados eficientes antes do desenvolvimento destes como micopesticidas (LACEY et al., 2015).

Essa abordagem se torna interessante considerando que não apenas os parâmetros de produção e virulência serão testados, mas também a ação dos efeitos abióticos sobre os isolados em teste.

Se tratando dos efeitos abióticos, estes atuam principalmente na capacidade e a velocidade com que os entomopatógenos podem infectar e colonizar seus hospedeiros, limitando assim o período que o microrganismo permanece ativo no agroecossistema (YEO et al., 2003).

Uma vez expostos no ambiente, os índices de efetividade poderão ser alterados de diferentes formas para microrganismos de uma mesma espécie. Os principais fatores abióticos atuantes sobre fungos entomopatogênicos são: a luz do sol, chuva, temperatura e umidade, sendo, a luz solar particularmente, a principal responsável pela inativação destes microrganismos. Além da inviabilização, esse componente ambiental também é capaz de retardar a germinação dos propágulos infecciosos (JARONSKI, 2010).

Nesse sentido, o ambiente em que o micopesticida será empregado deve ser considerado para o desenvolvimento de um produto comercial, bem como o tipo de propágulo e a formulação (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010).

De acordo com Faria e Wraight (2007), mais de 160 micoinseticidas já foram listados em todo o mundo. Entre esses, aproximadamente 75% dos produtos estão registrados, passando por registro ou comercialmente disponíveis. Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, e Orthoptera são as principais ordens das famílias de insetos os quais esses produtos são destinados, além de produtos destinados exclusivamente para o controle de ácaros e carrapatos.

Para os produtos disponíveis no mercado nacional ou em fase de registro, 55% das formulações correspondem a produtos à base de *M. anisopliae*. *B. bassiana* representa outros 30% dos produtos disponíveis no mercado, seguido de 7,5% à base de *Lecanicillium* e 7,5% de espécies identificadas como *Sporothrix insectorum* (MICHEREFF FILHO et al., 2009).

2.2.2. Produção massal e formulação de fungos entomopatogênicos

O controle microbiano através da utilização de produtos à base de fungos entomopatogênicos usualmente é praticado empregando doses inundativas de propágulos infecciosos (EILENBERG; HAJEK; LOMER, 2001). Nesse sentido, o método adotado para produção deve ser economicamente viável para produzir altas concentrações de propágulos ativos com efetividade em condições de campo (JACKSON, 1997).

Fungos entomopatogênicos apresentam diferentes estruturas de reprodução que podem ser empregadas para a produção massal. Micélio, blastosporo e conídios são os propágulos presentes na maioria dos micoinseticidas, sendo conídios e blastosporos as estruturas mais utilizadas como ingrediente ativo de micoinseticidas por serem infectivas ao hospedeiro (LEITE et al., 2003).

Conídios são as estruturas primárias de infecção da maioria dos entomopatógenos. Caracterizam-se por apresentar uma maior resistência às condições adversas do ambiente e fácil aderência à cutícula do hospedeiro devido à sua hidrofobicidade (LEITE et al., 2003). Em contato com a cutícula do inseto, através de estímulos químicos e físicos, os conídios germinam e penetram na cutícula. Na hemolinfa, o fungo sofre diferenciação, apresentando crescimento leveduriforme denominadas blastosporos, que exploram todos os nutrientes dos tecidos internos do inseto. A maioria dos Hypocreales apresentam esse crescimento dimórfico quando em meio líquido, semelhante ao observado na hemocele do inseto (MASCARIN; JARONSKI, 2016).

Para a produção de fungos entomopatogênicos, dois métodos diferentes podem ser adotados, a produção “in vivo”, utilizando o inseto hospedeiro ou “in vitro”, através de processos fermentativos, empregando-se diferentes tipos de substratos artificiais. A produção “in vitro” é predominantemente a mais utilizada e apresenta como vantagem a obtenção econômica de uma grande quantidade de propágulos em um curto período de tempo. Esse tipo de produção ocorre através da utilização de meios artificiais por três diferentes processos: I) meio sólido ou semi-sólido; II) meio líquido ou fermentação submersa; III) fermentação bifásica, no qual o crescimento vegetativo é iniciado no meio líquido e posteriormente os propágulos transferidos para o meio sólido para esporulação (ALVES, PEREIRA, 1998).

Diferentemente do que se observa para a produção utilizando fermentação sólida, a produção através da fermentação líquida ou submersa proporciona homogeneidade nutricional e um bom controle das variáveis ambientais, produzindo uma grande quantidade de blastosporos ativos em poucos dias. Esse é um ponto chave para o processo produtivo, visto

que na opção pela fermentação sólida, o tempo requerido para a obtenção dos propágulos pode chegar a semanas, aumentando o custo do produto final. Entretanto, blastosporos são estruturas naturalmente mais sensíveis, que necessitam do desenvolvimento de abordagens especiais para torná-los tolerantes a dessecação. Além disso, os investimentos iniciais são altos devido tecnologia empregada (JARONSKI, 2014).

Ambos os processos são utilizados, porém, a produção massal de conídios através de processos fermentativos em meio sólido ou através de fermentação bifásica utilizando o arroz como substrato é o método mais empregado. A adoção desse tipo de fermentação apresenta-se como uma boa opção principalmente para as espécies que produzem conídios aéreos, pois o substrato utilizado se adequa bem a esse processo disponibilizando os nutrientes necessários ao metabolismo desses microrganismos e permite uma boa extração dos conídios, sendo necessário para o processo de fermentação a utilização de uma tecnologia barata, porém com intensa mão de obra (ALVES et al., 2008b).

Em síntese, os dois métodos de produção apresentam vantagens e desvantagens que precisam ser analisados anteriormente a escolha por algum dos métodos. A decisão pelo melhor propágulo como ingrediente ativo de produtos à base de fungos entomopatogênicos deve considerar fatores como o custo do meio de produção e formulação, rendimento produtivo, virulência, persistência no campo, tolerância as condições ambientais, organismo alvo, condições de entrega do produto, tamanho de mercado, desempenho em condições de campo (MASCARIN; JARONSKI, 2016).

Por se tratar de um microrganismo, um ponto chave para o sucesso da ação inseticida é a manutenção dos propágulos fúngicos ativos até o contato com o inseto-alvo (BATISTA FILHO et. al, 1998). Produção massal e formulação são processos que podem alterar o tempo de prateleira, virulência e eficácia dos micoinseticidas em condições de campo (KASSA et al., 2008). Nesse sentido, a adoção de um controle de qualidade durante as diferentes etapas do processo aliado a adição de diferentes compostos visando a manutenção da viabilidade durante o armazenamento e o prolongamento da atividade inseticida após aplicação podem desempenhar um papel fundamental para os problemas de instabilidade de micoinseticidas.

O desenvolvimento de formulações de microrganismos deve atender alguns objetivos, incluindo a estabilização dos agentes microbianos durante distribuição e armazenamento, facilitar a manipulação e aplicação do produto, proteger o agente entomopatogênico contra os efeitos adversos do ambiente e prolongar o período de ação dos agentes em condições de campo (BRAR et al., 2006).

2.3. Métodos de seleção de isolados

Estudos de seleção de isolados são essenciais para o desenvolvimento de uma formulação que seja altamente efetiva em condições de campo. Desta forma, a identificação de isolados promissores deve ser a primeira etapa no desenvolvimento de um produto microbiano à base de fungos. Para Rezende (2014), esse processo deve ser iniciado a partir de um grande número de isolados provenientes de infecções naturais em insetos ou do solo e representa um dos pilares para o sucesso de um programa de controle biológico.

De um modo geral, o desempenho de fungos entomopatogênicos no controle de pragas está fortemente ligado a fatores bióticos e abióticos. Relativo aos fatores bióticos, estes dizem respeito as características intrínsecas de cada isolado que podem expressar por exemplo, a agressividade em causar a mortalidade de diferentes formas para microrganismos de uma mesma espécie (SHAPIRO-ILAN et al., 2005).

Quanto aos fatores abióticos, estes podem limitar a efetividade de fungos entomopatogênicos no controle de pragas, sendo, a radiação ultravioleta provavelmente o fator mais nocivo a esses microrganismos. Nesse sentido, a ideia desse tipo de estudo é selecionar além de candidatos com um alto rendimento produtivo em substrato e com alta virulência, isolados que apresentem naturalmente uma maior tolerância aos efeitos abióticos, principalmente a radiação ultravioleta (FERNANDES et al., 2015).

Poucos estudos consideram conjuntamente os parâmetros de produção em substrato, que no Brasil é feito predominantemente em arroz pré-cozido, e virulência. Em uma busca na base de dados “Web of Science”, para os trabalhos intitulados “seleção de isolados de fungos entomopatogênicos”, de 1997 a 2017, apenas 25% dos trabalhos levaram em consideração tais parâmetros, sendo que, na escolha de isolados para produção em larga escala ou para formulação de biopesticidas esses parâmetros devem fazer parte do processo de seleção, pois alguns isolados podem apresentar alta virulência e não necessariamente boa produção em substrato e vice-versa.

A maioria dos estudos que envolvem fungos entomopatogênicos abordam apenas a produção em arroz, ou em outros casos, o efeito letal sobre os organismos estudados. Para o efeito letal, a realização dos testes muitas vezes é inviabilizado pelo difícil estabelecimento de criações em laboratórios para algumas espécies, como é o caso da cigarrinha das raízes da cana-de-açúcar, *M. fimbriolata*. Desse modo, a adoção de espécies modelo que são facilmente criadas em laboratório torna-se interessante por permitir um “screening” mais rápido e pela possibilidade de comparar a virulência para um grande número de isolados.

Geralmente a seleção de isolados para o desenvolvimento de um produto é baseada em uma praga alvo em especial. Entretanto, comercialmente é interessante ter um isolado com uma ampla gama de hospedeiros, um exemplo disso é o produto Met-52[®] comercializado em vários países do mundo que é recomendado para o controle de várias espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”/ESALQ-USP. Para seleção de isolados promissores de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. para o controle de *M. fimbriolata* e *B. tabaci* Biótipo B, respectivamente, foram realizadas as seguintes etapas: A) seleção visual dos isolados que apresentaram melhor crescimento e esporulação em placas de Petri contendo meio de cultura (Figura 1.A); B) quantificação do rendimento produtivo em substrato sólido (arroz) (Figura 1.B); C) bioensaio utilizando o inseto-modelo *T. molitor* para selecionar os isolados que apresentam maior mortalidade (Figura 1.C); D) bioensaios utilizando uma única concentração do fungo com as “pragas-chave” *M. fimbriolata* e *B. tabaci* Biótipo B (Figura 1.D) e E) bioensaios testando diferentes concentrações para as “pragas-chave” (Figura 1.E).

Figura 1. Esquema simplificado das etapas desenvolvidas para a seleção de isolados promissores para o desenvolvimento de um micoinseticida.

3.1. Criação e manutenção de *Tenebrio Molitor*

A criação de *T. molitor* foi mantida no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, em sala climatizada com temperatura de 25 ± 5 °C; 65-80% de UR e 12 h de fotofase. Adultos de *T. molitor* foram acondicionados em bandejas plásticas de 33 cm de comprimento x 22 cm de

largura x 15 cm de altura, contendo uma dieta à base de farelo de trigo (50%) e farelo de soja (50%). Adicionalmente foi fornecida semanalmente cenoura picada em rodela. Foram dispostas folhas de papel toalha sobre a dieta para a postura dos insetos. Após a eclosão, larvas de *T. molitor* foram separadas com auxílio de peneira de malha fina e acondicionadas em novas caixas.

3.2. Criação e manutenção de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)

A criação de *B. tabaci* biótipo B foi iniciada utilizando posturas obtidas junto ao Centro de Fitossanidade do Instituto Agronômico, situado na cidade de Campinas – SP. Posteriormente, instalou-se uma criação no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP e os insetos foram mantidos em plantas de couve, em casa-de-vegetação com ventilação forçada.

3.3. Coleta de *Mahanarva fimbriolata*

Devido ao difícil estabelecimento de criações massais de *M. fimbriolata* em laboratório, os testes utilizando *Metarhizium* spp., foram realizados em ninfas coletadas diretamente no campo. Os bioensaios foram realizados nos períodos de dezembro/2015 a fevereiro/2016, período que está relacionado com condições naturais de alta umidade e temperatura e coincide com uma maior ocorrência da espécie no campo. As coletas foram realizadas em um canavial pertencente a usina Iracema que está localizada na cidade de Iracemápolis – SP.

3.4. Origem e identificação dos Isolados

Foram escolhidos 100 isolados de *Metarhizium* spp. e 100 isolados de *Beauveria* spp. da Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz (Anexos 1 e 2). Quarenta e nove isolados de *Metarhizium* sp. e 91 isolados de *Beauveria* sp. se encontram depositados na coleção desde a década de 80. Outros 51 isolados de *Metarhizium* spp. e 9 isolados de *Beauveria* spp. foram depositados na coleção nos anos de 2012 e 2013. Esses isolados foram recuperados de amostras de solos dos

biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa como atividade do PROJETO SISBIOTA desenvolvido no laboratório.

Entre os 100 isolados de *Metarhizium* spp., 64 foram caracterizados por análise molecular nos estudos de Rezende (2015), sendo 58 isolados identificados como *M. anisopliae* e seis isolados identificados como *M. robertsii*. Além destes, nos estudos de Zanardo (2015) outros três isolados foram caracterizados, sendo dois deles *M. anisopliae* e um *M. robertsii*. Os outros 33 isolados que foram utilizados para seleção visual não foram previamente caracterizados por análise molecular.

O teste de rendimento de conídios em substrato contou com 50 isolados, sendo, 41 isolados de *M. anisopliae*, dois isolados de *M. robertsii* e sete isolados não foram identificados para a determinação da espécie. Desse total, 22 isolados foram recuperados de amostras de solo e outros 28 de insetos. Para o bioensaio com o inseto modelo *T. molitor*, entre os 25 isolados utilizados, 21 pertenciam a espécie *M. anisopliae* e para os outros quatro isolados, não foi determinada a espécie, sendo que desse total, 10 isolados foram recuperados de amostras de solo e outros 15 de inseto. Para o bioensaio utilizando *M. fimbriolata*, nove entre os 10 isolados selecionados pertenciam a espécie *M. anisopliae*, sendo um recuperado de amostras de solo e oito de infecções naturais sobre insetos. O isolado de *Metarhizium* sp. selecionado para os bioensaios utilizando *M. fimbriolata* (item 3.8) juntamente com os isolados de *Beauveria* spp., selecionados para os bioensaios com *B. tabaci* Biotipo B (item 3.10) foram caracterizados por análise molecular e identificados como *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

A extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e preparação das placas para sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP. O locus do DNA nuclear analisado para *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. foi a região 5' contida no fator de alongamento da tradução 1 alfa (5'-TEF) (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; REHNER; BUCKLEY, 2005; REHNER et al., 2011). Os *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento da região 5' TEF de *Metarhizium* sp. foram EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e de acordo com Bischoff, Rehner e Humber (2009) e para *Beauveria* sp. foram 983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT) conforme Rehner e Buckley, (2005). O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando os equipamentos 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Califórnia, USA) do CEBTEC (Laboratório de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil).

3.5. Teste de rendimento produtivo em arroz

Uma seleção preliminar foi realizada através de avaliações visuais do crescimento e esporulação dos isolados em placas de Petri. O objetivo foi selecionar entre os 100 isolados de cada gênero, os 50 isolados com maior crescimento e esporulação em meio de cultivo, sendo utilizado para *Metarhizium spp.* o meio BDA (Batata, Dextrose, Agar; DifcoTM) e para *Beauveria spp.* foi utilizado o meio Meio Completo (MC), que contém fosfato de potássio, fosfato de sódio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, glucose, nitrato de sódio, extrato de levedura e ágar na composição.

Os 50 isolados selecionados de *Metarhizium spp.* e de *Beauveria spp.* foram inoculados em 50 gramas de arroz parboilizado presentes em frascos com tampa rosqueável e anel antigota de 250 ml (LABORGLAS[®]). Antes da inoculação da suspensão fúngica, os grãos permaneceram submersos em água por 50 minutos e posteriormente a água foi retirada com o auxílio de uma peneira de malha fina e autoclavados a 120°C por 20 min.

O inóculo foi obtido a partir de uma placa de Petri por isolado através da raspagem do fungo e transferido para tubos de ensaio contendo 20 mL de água com Tween 80[®] (0,05%). Cinco mL desta suspensão foi inoculado nos frascos em câmara de fluxo vertical. Foram utilizados quatro frascos (repetições), totalizando 200 frascos por gênero estudado. Os frascos permaneceram incubados por 14 dias em incubadora B.O.D. à $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Após o período de incubação, nos frascos contendo arroz mais fungo, foi adicionado 150 ml de água destilada com Tween 80[®] (0,05%) e agitadas em mesa agitadora orbital a 300 RPM durante 30 minutos, para o desprendimento dos conídios do substrato. A quantificação dos conídios produzidos foi realizada após diluições em série e com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.6. Bioensaio utilizando *Tenebrio molitor* como inseto modelo

Foram avaliados 25 isolados de cada um dos gêneros estudados, escolhidos dentre os que apresentaram melhor rendimento produtivo em arroz mais o tratamento controle (água destilada mais Tween 80[®], na concentração de 0,05%), totalizando 26 tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições contendo 11 larvas de *T. molitor* com comprimento de 1 a 1,5 cm. As larvas foram dispostas em placas de Petri (14 cm de diâmetro) e sobre elas foram aplicados, em torre de Potter a 15 libras.pól⁻², 2mL de suspensão contendo

1×10^8 conídios.mL⁻¹ de cada isolado dos fungos entomopatogênicos. Em seguida, as larvas foram realocadas para placas de Petri menores (6 cm de diâmetro) forradas com papel filtro, contendo cenoura como fonte de alimento. As placas foram acondicionadas em câmaras climatizadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase. A troca do alimento foi realizada diariamente assim como a avaliação da mortalidade até o 13º dia após a aplicação. Os insetos mortos foram transferidos para câmara úmida para confirmação da mortalidade pelo patógeno através da esporulação sobre a superfície dos insetos.

3.7. Screening inicial com concentração única de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Mahanarva fimbriolata*

A técnica utilizada para realização deste bioensaio foi semelhante à desenvolvida por Rezende (2014). Mini rebolos com gemas foram plantados em copos descartáveis de 200 mL. Aproximadamente 60 dias após o plantio quando as plantas de cana-de-açúcar estavam com 20 a 30 cm de altura, os copos foram recortados a 2,5 cm abaixo da borda superior e a parte inferior foi retirada para permitir a exposição das raízes. Tampas de copos descartáveis de 500 mL foram recortadas em formato circular de 5,5 cm de diâmetro, permitindo o encaixe da muda de cana para exposição das raízes e alimentação das ninfas de *M. fimbriolata*, confinadas durante o período experimental (Figura 2.A).

Cinco ninfas foram confinadas em cada copo diretamente em contato com as raízes das plantas e após 24 horas da infestação foi feita a aplicação do fungo (Figura 2.B). Foram testados 10 isolados do fungo *M. anisopliae*, juntamente com o tratamento controle onde foi aplicado somente água destilada mais Tween 80® (0,05%), sendo 6 repetições por tratamento. Dentre estes, cinco isolados foram selecionados por causar alta porcentagem de mortalidade ao inseto modelo *T. molitor* (ESALQ 4676, ESALQ 1116, ESALQ 3732, ESALQ 867 e ESALQ 1037). Os outros cinco isolados selecionados causaram baixa mortalidade a *T. molitor* (ESALQ 1452, ESALQ 1641, ESALQ 1597, ESALQ 412 e ESALQ 425).

Trezentos µL (microlitros) de uma suspensão contendo 1×10^7 conídios.mL⁻¹ de cada isolado foi aplicado sobre as ninfas que estavam fixadas nas raízes das plantas e protegidas pela espuma produzida naturalmente pela espécie, com o auxílio de um pulverizador do tipo *airbrush*®. As avaliações de mortalidade ocorreram diariamente até o 10º dia após aplicação, sendo os cadáveres das ninfas recolhidos e acondicionados em câmara úmida para confirmação da mortalidade pelo patógeno. O bioensaio foi instalado duas vezes em tempos

diferentes e mantido em sala climatizada a $26,5 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 12h de fotofase.

Figura 2. A. Vista do experimento sobre a eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Mahanarva fimbriolata* em plantas de cana-de-açúcar fixadas em copos descartáveis e B. Ninfas de *Mahanarva fimbriolata* aderidas às raízes de cana-de-açúcar; seta indicando ninfa esporulada por *M. anisopliae*.

3.8. Virulência de isolados de *Metarhizium anisopliae* a ninfas de *Mahanarva fimbriolata*

O bioensaio com diferentes concentrações foi realizado utilizando quatro isolados, sendo selecionados para essa etapa, o isolado ESALQ 1641 (mais virulento para ninfas de *M. fimbriolata*), ESALQ 1037 (menos virulento para ninfas de *M. fimbriolata*), ESALQ 1184 (mais produtivo em arroz) e ESALQ 1204 (menos produtivo em arroz). As concentrações utilizadas foram 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹, com seis repetições para cada isolado. Cada repetição consistiu de cinco ninfas de *M. fimbriolata*, seguindo a metodologia descrita anteriormente no item 3.7.

3.9. Screening inicial com concentração única de *Beauveria bassiana* em ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B

Plantas de soja foram cultivadas em bandejas de isopor utilizadas para cultivo de hortaliças, até o desenvolvimento completo da primeira folha trifoliolada, correspondente ao estágio V2 (± 15 a 20 cm de altura). Posteriormente, as plantas de soja foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 50 mL (Figura 3.A) e dispostas em bancadas da casa de vegetação

onde estava localizada a criação de *B. tabaci* Biótipo B, para infestação com adultos e a realização de postura. As plantas permaneceram infestadas com adultos por 1 a 2 dias, de modo que em pré-avaliação utilizando microscópio estereoscópio verificou-se uma média entre 30 a 50 ovos por folíolo. Posteriormente, os adultos foram retirados das plantas para cessar a postura e as mesmas transferidas para casa de vegetação livres da presença de adultos, para o desenvolvimento uniforme das ninfas de *B. tabaci* Biótipo B. A aplicação dos diferentes isolados (tratamentos) foram feitos sobre ninfas de 2º e 3º instar que ocorreu aproximadamente 12 – 15 dias após infestação.

Quatro isolados de *B. bassiana* que causaram alta mortalidade sobre larvas de *T. molitor* (ESALQ 537, ESALQ 540, ESALQ 749, ESALQ 1135), juntamente com os cinco de baixa mortalidade (ESALQ 476, ESALQ 447, ESALQ 543, ESALQ 4958 e ESALQ 650) e o isolado ESALQ PL43, utilizado por ser um isolado registrado, foram pulverizados sobre ninfas de *B. tabaci* Biótipo B.

Ao total foram 11 tratamentos, sendo 10 isolados do patógeno mais o tratamento controle com água destilada mais Twen 80® (0,05%). Cada tratamento foi composto por quatro folhas, sendo que cada folha (repetição) apresentava três folíolos com uma média de 30 – 50 ninfas entre 2º e 3º instar por folíolo. Uma suspensão contendo 5×10^6 conídios.mL⁻¹ de cada isolado foi aplicada sobre as ninfas, até o ponto de molhamento, com o auxílio de um pulverizador do tipo *airbrush*®. As avaliações de mortalidade ocorreram diariamente até o 10º dia após aplicação, sendo, os cadáveres considerados mortos pela ação do fungo aqueles de aspecto opaco e coloração avermelhada, causada pela ação da oosporina (ALVES, 1998b) (Figura 3.B). O bioensaio foi instalado duas vezes em tempos diferentes e mantido em sala climatizada a $26 \pm 3^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 12h de fotofase.

Figura 3. A. Vista do experimento sobre a eficiência de *Beauveria bassiana* a ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B em plantas de soja cultivadas em tubos do tipo Falcon (50mL). B. Ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B; seta indicando ninfa infectada por *B. bassiana*.

3.10. Virulência de isolados de *Beauveria bassiana* a ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B

O bioensaio com diferentes concentrações foi realizado utilizando quatro isolados, sendo, ESALQ 4958 (mais virulento para ninfas de *B. tabaci* Biotipo B), ESALQ 447 (menos virulento para ninfas de *B. tabaci* Biotipo B), ESALQ 543 (mais produtivo em arroz) e ESALQ 604 (menos produtivo em arroz). As concentrações utilizadas foram 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹, com quatro repetições para cada isolado, seguindo a metodologia descrita anteriormente no item 3.9. As avaliações de mortalidade ocorreram diariamente até o 7º dia após aplicação.

3.11. Análises Estatísticas

O teste de produção e os bioensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente aleatorizado. Para os testes de produção de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp., as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (Scott e Knott, 1974), considerando um nível de 5% de significância. Para isso foi utilizado o pacote ScottKnott (JELIHOVSCHI; FARIA; ALLAMAN, 2014) do software “R” (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

Para o bioensaio utilizando *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. sobre larvas do inseto modelo *T. molitor*, modelos quase-binomiais foram ajustados para os dados de mortalidade total e confirmada. Testes “F” foram realizados utilizando modelos lineares generalizados

(GLM) (pacote multcomp “R”) através da ANOVA e as médias comparadas por Tukey para diferença honestamente significativa (HSD). As análises foram realizadas utilizando o software estatístico “R”, versão 3.0.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

Para os bioensaios utilizando ninfas de *M. fimbriolata*, os dados de mortalidade foram submetidos a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando o teste Log Rank (Mantel-Cox) do software estatístico IBM SPSS Statistics [v. 22.0.0, (2013)] e para os dados de mortalidade total e confirmada de ninfas de *M. fimbriolata*, foram ajustados modelos binomiais. Testes “Qui-quadrado” foram realizados para avaliar a significância por meio de GLM (pacote multcomp R) através da ANOVA e Tukey (HSD) para a comparação de médias. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico “R”, versão 3.0.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

Para os bioensaios utilizando ninfas de *B. tabaci* Biotipo B, os dados de mortalidade foram submetidos a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando o teste Log Rank (Mantel-Cox) do software estatístico IBM SPSS Statistics [v. 22.0.0, (2013)] e para os dados com diferentes concentrações foram ajustados modelos log-logísticos ou logísticos com pressuposto de distribuição binomial usando o pacote 'drc' (RITZ et al., 2015) no ambiente estatístico “R” 3.2.4 (R Core Team, 2016). O modelo foi ajustado aos dados de concentração-mortalidade separadamente para cada isolado. Como a superdispersão (i.e., heterogeneidade de variância) foi detectada nos conjuntos de dados, implementamos essa variação extrabinômica no modelo, o que possibilitou a correção de erros padrão dos parâmetros do modelo com intervalo de confiança de 95% das concentrações letais medias (CL₅₀).

Considerando as variáveis respostas analisadas (n=4) (rendimento de conídios, mortalidade de larvas de *T. molitor* por *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp., mortalidade de ninfas de *M. fimbriolata* por *M. anisopliae*, sendo instalado duas vezes em tempos distintos e mortalidade de ninfas de *B. tabaci* Biótipo B por *B. bassiana*, também instalado duas vezes em tempos distintos), os dados foram submetidos a análises de cluster utilizando-se as distâncias euclidianas, sendo os clusters calculados pelo método hierárquico de Ward e suportados por valores “approximately unbiased” (AU). Os valores de P foram calculados através de reamostragens de bootstrap (1000 repetições). A análise de agrupamento foi realizada utilizando o pacote R "pvclust" (Suzuki e Hidetoshi, 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados

4.1.1. Seleção de isolados em meio de cultura

Como parâmetro de avaliação, os 50 isolados que visualmente apresentaram maior crescimento e esporulação em placas de Petri, nos respectivos meios de cultivo para cada gênero, foram selecionados para o teste de rendimento produtivo e encontram-se marcados nos Anexos A e B.

4.1.2. Teste de rendimento produtivo em arroz

O rendimento produtivo dos isolados de *Metarhizium* spp., utilizando arroz como substrato para crescimento fúngico apresentou diferenças significativas, de modo que os isolados foram divididos em três grupos (A, B e C), de acordo com o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (Figura 4).

No grupo A foram incluídos os 33 isolados que apresentaram os maiores índices de rendimento de conídios (TJR IX, ESALQ 866, ESALQ 1614, ESALQ 1595, ESALQ 5234, ESALQ 1097, ESALQ 1076, ESALQ 1175, ESALQ 5239, ESALQ 1643, ESALQ 4934, ESALQ 1606, ESALQ 1022, ESALQ 4676, ESALQ 3732, ESALQ 1610, ESALQ 867, ESALQ 1037, ESALQ 412, ESALQ 1641, ESALQ 816, ESALQ 425, ESALQ 865, ESALQ 1452, ESALQ 1116, ESALQ 860, ESALQ 1597, ESALQ 1607, ESALQ 959, ESALQ 1642, ESALQ 4922, ESALQ 1405, ESALQ 1184), sendo registrada entre esses isolados, uma variação entre $1,55 \pm 0,281 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado TJR IX e $2,48 \pm 0,274 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 1184.

O grupo B foi composto por 15 isolados de produtividade intermediária (ESALQ 1634, ESALQ 49, ESALQ 1256, ESALQ 353, ESALQ 1104, ESALQ 43, TH7 III, ESALQ 1613, ESALQ 1387, ESALQ 5311, ESALQ 333, ESALQ 1644, ESALQ 1635, ESALQ 1616, ESALQ 1444) que apresentaram rendimento de conídios variando entre $9,21 \pm 2,12 \times 10^8$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 1634 e $1,48 \pm 0,352 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 1444.

O grupo C encerrou a lista dos 50 isolados utilizados nesse estudo e foi composto por apenas dois isolados que apresentaram os menores índices de produção (ESALQ 4844, ESALQ 1204) sendo de $1,13 \pm 0,357 \times 10^8$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 1204 e $1,52 \pm 0,705 \times 10^8$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 4844.

Como descrito na metodologia do item 3.6, os 25 isolados que apresentaram os maiores valores de rendimento de conídios foram selecionados para os testes utilizando o inseto modelo *T. molitor*. Para *Metarhizium* spp., a seleção dos isolados ficou restrita apenas aos isolados do grupo A.

Figura 4. Rendimento de conídios.grama de arroz⁻¹ (média e intervalo de confiança) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. produzidos via fermentação sólida e agrupados em três grupos (A, B e C) pelo teste de médias de Scott-Knott, considerando um nível de 5% de significância

Para os isolados de *Beauveria* spp., uma maior diferenciação quanto aos níveis de rendimento de conídios permitiu a separação dos isolados em quatro grupos (A, B, C e D), de acordo com o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (Figura 5).

O grupo A compreendeu os 12 isolados mais produtivos (ESALQ 1054, ESALQ 457, ESALQ 547, ESALQ 540, ESALQ 688, ESALQ 843, ESALQ 447, ESALQ 752, ESALQ 476, ESALQ 650, ESALQ 749, ESALQ 543), estando o rendimento médio de conídios desse grupo variando entre $5,54 \pm 0,68 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 1054 a $7,69 \pm 1,763 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ para o isolado ESALQ 543.

Dentro do grupo B, foram reunidos os 15 isolados pertencentes ao segundo grupo mais produtivo (ESALQ 618, ESALQ 647, ESALQ 570, ESALQ 642, ESALQ 619, ESALQ 569, ESALQ 536, ESALQ 603, ESALQ 834, ESALQ 4955, ESALQ 537, ESALQ 1135, ESALQ 4958, ESALQ 611, ESALQ 548). A variação do rendimento de conídios registrada para esse grupo foi de $3,96 \pm 0,626 \times 10^9$ (ESALQ 618) a $5,18 \pm 0,490 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ (ESALQ 548).

Para o grupo C, o rendimento de conídios variou entre $2,06 \pm 0,86 \times 10^9$ (ESALQ 846) a $3,63 \pm 0,955 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹ (ESALQ 1432) e o grupo foi composto por mais 11 isolados (ESALQ 596, ESALQ 574, ESALQ 4951, ESALQ 4954, ESALQ 353, ESALQ 535, ESALQ 616, ESALQ PL63, ESALQ 644, ESALQ PL61, ESALQ 572).

Encerrando os 50 isolados de *Beauveria* spp., o grupo D foi composto por 10 isolados que apresentaram as menores médias de produção de conídios (ESALQ 604, ESALQ 739, ESALQ 2272, ESALQ 4953, ESALQ 4957, ESALQ 434, ESALQ 4956, ESALQ 4952, ESALQ 879, ESALQ 1075). ESALQ 604 foi o isolado de menor produção entre todos isolados, $3,06 \pm 0,613 \times 10^8$ conídios.grama de arroz⁻¹.

Para o bioensaio utilizando *T. molitor*, os 25 isolados de *Beauveria* spp. utilizados foram provenientes dos grupos A, B e C, dos quais, treze pertenciam ao grupo A, 11 ao grupo B e apenas 2 ao grupo C.

Figura 5. Rendimento de conídios.grama de arroz⁻¹ (média e intervalo de confiança) de diferentes isolados de *Beauveria* spp. produzidos via fermentação sólida e agrupados pelo teste de médias de Scott-Knott, considerando um nível de 5% de significância

4.1.3. Bioensaio utilizando *Tenebrio molitor* como inseto modelo

Todos os isolados de ambos os gêneros estudados foram patogênicos às larvas do inseto modelo *T. molitor*, sendo observada uma alta variação de mortalidade (Tabela 1). *Metarhizium* spp. apresentou diferença significativa para os dados médios de mortalidade total ($F_{25,104}=166,01$; $P<0,001$), variando de $30,9 \pm 6,8\%$ para o isolado ESALQ 1452 a $90,9 \pm 2,9\%$ para o isolado ESALQ 4676. Os dados de mortalidade confirmada também apresentaram diferença significativa ($F_{25,104}=132,12$; $P<0,001$), sendo observada uma variação entre $29,1 \pm 7,8\%$ e $89,1 \pm 3,4$ para os mesmos isolados, respectivamente. Sessenta e oito por cento (17 isolados) dos isolados utilizados do estudo apresentaram mortalidade total e confirmada acima de 50% e o tempo letal mediano (TL_{50}) variou de 6 a 13 dias.

Tabela 1. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL₅₀), Intervalo de confiança (IC) e teste Log Rank (Mantel-Cox) de larvas de *Tenebrio molitor* após a aplicação de diferentes isolados de *Metarhizium* spp.

Tratamento	Mortalidade Total (%)	Mortalidade Confirmada (%)	TL ₅₀ (dias)	IC (95%)	Log Rank (Mantel-Cox)
ESALQ 4676	90,9 ± 2,9 a	89,1 ± 3,4 a	6 ± 0,2	5,7 - 6,3	a
ESALQ 1116	83,6 ± 3,4 ab	83,6 ± 3,4 ab	7 ± 0,2	6,5 - 7,5	b
ESALQ 3732	81,8 ± 5,0 ab	81,8 ± 5,0 ab	7 ± 0,6	5,9 - 8,1	bc
ESALQ 867	72,7 ± 5,0 ab	72,7 ± 5,0 ab	9 ± 0,8	7,4 - 10,6	c
ESALQ 959	72,7 ± 9,1 ab	70,9 ± 5,0 ab	10 ± 0,8	8,5 - 11,6	c
ESALQ 1037	70,9 ± 4,6 ab	70,9 ± 4,6 ab	10 ± 1,0	8,0 - 12,0	c
ESALQ 1643	70,9 ± 6,7 ab	70,9 ± 6,7 ab	10 ± 0,5	9,0 - 11,0	c
ESALQ 1607	65,5 ± 6,0 ab	65,5 ± 6,0 ab	11 ± 1,0	9,0 - 13,0	cd
ESALQ 4934	65,5 ± 5,3 ab	65,5 ± 5,3 ab	9 ± 0,6	7,8 - 10,2	cd
ESALQ 4922	63,6 ± 6,4 ab	63,6 ± 6,4 ab	10 ± 0,4	9,1 - 10,9	cd
ESALQ 865	61,8 ± 7,3 b	61,8 ± 7,3 ab	11 ± 0,7	9,6 - 12,5	cd
ESALQ 1405	60,0 ± 10,6 b	60,0 ± 10,6 ab	13 ± 1,6	9,9 - 16,1	cd
ESALQ 1022	60,0 ± 9,4 b	58,2 ± 11,0 ab	11 ± 0,9	9,2 - 12,8	cd
ESALQ 1610	60,0 ± 11,4 b	60,0 ± 11,4 ab	12 ± 1,4	9,3 - 14,7	cd
ESALQ 1642	54,6 ± 2,9 b	52,7 ± 3,4 b	13 ± 0,9	11,2 - 14,8	d
ESALQ 5239	54,6 ± 12,5 b	54,6 ± 12,5 b	12 ± 0,5	-	d
ESALQ 860	54,6 ± 4,1 b	52,7 ± 4,5 b	12 ± 1,1	-	d
ESALQ 816	50,9 ± 7,4 b	47,3 ± 6,0 b	13 ± 0,5	-	d
ESALQ 1184	45,5 ± 5,0 b	45,5 ± 5,0 b	-	-	e
ESALQ1606	43,6 ± 6,0 b	43,6 ± 6,0 b	-	-	de
ESALQ 425	41,8 ± 3,6 b	40,0 ± 3,6 b	-	-	de
ESALQ 412	41,8 ± 7,4 b	41,8 ± 7,4 b	-	-	de
ESALQ 1597	36,4 ± 7,0 b	36,4 ± 7,0 b	-	-	de
ESALQ 1641	32,7 ± 6,1 b	30,9 ± 7,4 b	-	-	e
ESALQ 1452	30,9 ± 6,8 b	29,1 ± 7,8 b	-	-	e
CONTROLE	0	0	-	-	-
<i>p</i> <	0,001	0,001			

Médias (± Erro Padrão) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (*p*<0,001)

Para *Beauveria* spp., de um total de 25 isolados utilizados no bioensaio, 92% (23 isolados) apresentaram mortalidade total e confirmada acima de 50% e destes, 13 apresentaram mortalidade acima de 85% (Tabela 2). A mortalidade total média de larvas de *T. molitor* apresentou diferença estatística ($F_{24,100}=163,32$; $P<0,001$) com uma variação entre $5,45 \pm 3,64$ para o isolado ESALQ 476 e $96,36 \pm 2,23$ para o isolado ESALQ 537, sendo os valores obtidos semelhante ao da mortalidade confirmada para esses isolados que também apresentaram diferença estatística ($F_{24,100}=162,99$; $P<0,01$). O TL₅₀ variou entre 6 e 8 dias e também estão expressos na referida tabela.

Tabela 2. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança de larvas de *Tenebrio molitor* (IC) após a aplicação de diferentes isolados de *Beauveria* spp.

Tratamento	Mortalidade total (%)	Mortalidade Confirmada (%)	TL ₅₀ (dias)	IC a 95% (dias)	Log Rank (Mantel-Cox)
ESALQ 537	96,4 ± 2,2 a	96,4 ± 2,2 a	6 ± 0,2	5,6 - 6,4	a
ESALQ 540	96,4 ± 3,6 a	96,4 ± 3,6 a	6 ± 0,1	5,8 - 6,2	b
ESALQ 749	96,4 ± 2,2 a	96,4 ± 2,2 a	6 ± 0,1	5,8 - 6,2	bc
ESALQ 536	94,6 ± 3,6 a	94,6 ± 3,6 a	6 ± 0,1	5,8 - 6,2	c
ESALQ 1135	94,6 ± 5,5 a	94,6 ± 5,5 a	6 ± 0,2	5,7 - 6,3	c
ESALQ 1432	92,7 ± 7,0 a	92,7 ± 7,0 a	6 ± 1,0	5,8 - 6,2	c
ESALQ 457	90,9 ± 5,0 a	90,9 ± 5,0 a	6 ± 0,1	5,7 - 6,3	c
ESALQ 603	90,9 ± 4,1 a	90,9 ± 4,1 a	6 ± 0,1	5,7 - 6,3	c
ESALQ 611	90,9 ± 5,0 a	90,9 ± 5,0 a	7 ± 0,2	6,5 - 7,5	d
ESALQ 688	90,9 ± 4,5 a	90,9 ± 4,5 a	6 ± 0,2	5,7 - 6,3	e
ESALQ 569	87,3 ± 3,6 a	87,3 ± 3,6 a	7 ± 0,2	6,6 - 7,4	f
ESALQ 834	85,5 ± 4,6 a	85,5 ± 4,6 a	8 ± 0,2	7,5 - 8,5	f
ESALQ 547	85,5 ± 4,6 a	83,6 ± 4,5 ab	7 ± 0,3	6,5 - 7,5	f
ESALQ 619	83,6 ± 1,8 ab	83,6 ± 1,8 ab	7 ± 0,2	6,5 - 7,5	f
ESALQ 548	80,0 ± 3,4 ab	80,0 ± 3,4 ab	7 ± 0,2	6,5 - 7,5	f
ESALQ 843	80,0 ± 4,5 ab	80,0 ± 4,5 ab	8 ± 0,4	7,2 - 8,8	f
ESALQ 4955	80,0 ± 7,8 ab	80,0 ± 7,8 ab	6 ± 0,1	5,7 - 6,3	f
ESALQ PL63	80,0 ± 6,0 ab	80,0 ± 6,0 ab	7 ± 0,3	6,4 - 7,7	fg
ESALQ 752	78,2 ± 8,4 ab	78,2 ± 8,4 ab	7 ± 0,3	6,3 - 7,7	fg
ESALQ 650	76,4 ± 7,4 ab	76,4 ± 7,4 ab	8 ± 0,5	7,0 - 9,0	g
ESALQ 1054	76,4 ± 7,4 ab	76,4 ± 7,4 ab	7 ± 0,4	6,1 - 7,9	g
ESALQ 4958	67,3 ± 9,4 ab	67,3 ± 9,4 ab	8 ± 0,7	6,6 - 9,4	g
ESALQ 543	50,9 ± 9,4 b	50,9 ± 9,4 b	7 ± 0,7	5,6 - 8,5	h
ESALQ 447	5,5 ± 3,6 c	5,5 ± 3,6 c	-	-	i
ESALQ 476	5,5 ± 3,6 c	5,5 ± 3,6 c	-	-	i
CONTROLE	0	0	-	-	-
<i>p</i> <	0,001	0,001			

Médias (± Erro Padrão) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,001$)

4.1.4. Screening inicial com concentração única de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Mahanarva fimbriolata*

No primeiro bioensaio, a sobrevivência de ninfas de *M. fimbriolata* foi estatisticamente diferente entre os tratamentos ($\chi^2=29,892$; $df=10$; $P \leq 0,001$). A mortalidade após 10 dias [Log Rank (Mantel-Cox)] (Tabela 3), variou entre $13,3 \pm 6,7\%$ no tratamento controle a $65,5 \pm 14,1\%$ para o isolado ESALQ 1641. Pela análise de sobrevivência, diferença significativa foi observada para os tratamentos ESALQ 1641 e ESALQ 1452 em relação aos

isolados ESALQ 1037 e ESALQ 425 e o tratamento controle. Os outros isolados utilizados não diferiram estatisticamente entre si.

Para a mortalidade confirmada, a variação observada foi de $24,1 \pm 10,8\%$ para o isolado ESALQ 425, com a menor média registrada a $58,6 \pm 14,1\%$ para o isolado ESALQ 1641. Entretanto, para esses dados não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($\chi^2_{9,50}=79,15$; $P<0,05$).

ESALQ 1597, ESALQ 412, ESALQ 867 e ESALQ 3732 apresentaram valores de mortalidade total acima de 50%, e mortalidade confirmada de $34,6 \pm 13,4$; $19,2 \pm 6,1$; $39,3 \pm 8,0$ e $44,4 \pm 8,9\%$, respectivamente. Para esses isolados foi possível a determinação do TL_{50} variando de 6 a 8 dias. ESALQ 1116, ESALQ 4676, ESALQ 1037 e ESALQ 425 causaram mortalidade com porcentagens inferiores a 50%, portanto não foi determinado o TL_{50} .

No segundo bioensaio, a sobrevivência de ninfas de *M. fimbiolata* também foi estatisticamente diferente entre os tratamentos ($\chi^2=18,195$; $df=10$; $p\leq 0,05$). A mortalidade após 10 dias de avaliação [Log Rank (Mantel-Cox)] variou entre $13,3 \pm 6,7\%$ (controle) a $56,7 \pm 9,5\%$ (isolado ESALQ 1641). Assim como no primeiro bioensaio, ESALQ 1641 causou os maiores percentuais de mortalidade (Tabela 4). De acordo com a análise de sobrevivência, diferença significativa foi observada dos tratamentos com ESALQ 1641 e ESALQ 4676 em relação aos isolados ESALQ 412 e ESALQ 1037 e o controle. Não foi observada diferenças entre os outros isolados.

A mortalidade confirmada no segundo bioensaio variou de $6,7 \pm 4,2$ para o isolado ESALQ 1037 a $46,7 \pm 6,7$ para ESALQ 1641, não sendo observada diferenças estatísticas para esses valores ($\chi^2_{9,50}=65,94$; $P<0,05$).

ESALQ 1641 e ESALQ 4676 foram os únicos com percentuais de mortalidade totais superiores a 50%, sendo o TL_{50} determinado para esses isolados de $9 \pm 0,63$ (IC= 7,75-10,25) e $8 \pm 0,43$ dias (IC= 7,16 – 8,84), respectivamente.

Tabela 3. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança (IC) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* após a aplicação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Tratamento	Mortalidade Total (%)*	Mortalidade Confirmada (%)	TL ₅₀ (dias)	IC (95%) (dias)	Log Rank (Mantel-Cox)
ESALQ 1641	65,5 ± 14,1a	58,6 ± 14,1 a	6 ± 0,8	4,4 - 7,6	a
ESALQ 1452	56,7 ± 8,0 a	40,0 ± 7,3 a	7 ± 1,0	4,8 - 11,2	a
ESALQ 1597	53,8 ± 9,9 ab	34,6 ± 13,4 a	8 ± 1,7	4,8 - 11,2	ab
ESALQ 412	53,8 ± 8,4 ab	19,2 ± 6,1 a	6 ± 1,1	3,9 - 8,1	ab
ESALQ 867	53,6 ± 4,5 ab	39,3 ± 8,0 a	7 ± 0,6	5,9 - 8,1	ab
ESALQ 3732	51,9 ± 11,1 ab	44,4 ± 8,9 a	8 ± 2,2	3,7 - 12,3	ab
ESALQ 1116	46,7 ± 4,21 ab	33,3 ± 8,4 a	-	-	ab
ESALQ 4676	46,4 ± 6,1 ab	35,7 ± 8,4 a	-	-	ab
ESALQ 1037	32,1 ± 10 ab	17,9 ± 6,1 a	-	-	b
ESALQ 425	27,6 ± 6,7 ab	24,1 ± 10,8 a	-	-	b
CONTROLE	13,3 ± 6,7 b	-	-	-	b
<i>p</i> <	0,05	0,05			

* - Médias de mortalidade obtidas no primeiro bioensaio seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 4. Mortalidade total e confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança (IC) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* após a aplicação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Tratamento	Mortalidade Total (%)*	Mortalidade Confirmada (%)	TL ₅₀ (dias)	IC (95%) (dias)	Log Rank (Mantel-Cox)
ESALQ 1641	56,7 ± 9,5 a	46,7 ± 6,7 a	9 ± 0,6	7,8 - 10,3	a
ESALQ 4676	56,7 ± 17,4 a	40,0 ± 11,5 a	8 ± 0,4	7,2 - 8,8	a
ESALQ 1116	46,7 ± 10,3 ab	26,7 ± 6,7 a	-	-	ab
ESALQ 3732	40,0 ± 11,5 ab	23,3 ± 9,5 a	-	-	ab
ESALQ 1452	40,0 ± 3,3 ab	23,3 ± 3,3 a	-	-	ab
ESALQ 867	36,7 ± 8,0 ab	20,0 ± 8,9 a	-	-	ab
ESALQ 425	33,3 ± 11,2 ab	20,0 ± 10,3 a	-	-	ab
ESALQ 1597	33,3 ± 9,9 ab	16,7 ± 6,1 a	-	-	ab
ESALQ 412	30,0 ± 8,6 ab	16,7 ± 8,0 a	-	-	b
ESALQ 1037	30,0 ± 6,8 ab	6,7 ± 4,2 a	-	-	b
CONTROLE	13,3 ± 6,7 b	-	-	-	b
<i>p</i> <	0,05	0,05			

*- Médias de mortalidade obtidas no segundo bioensaio seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

4.1.5. Análise de cluster para os isolados de *Metarhizium anisopliae*

A análise de cluster para os isolados de *M. anisopliae* sugeriu a formação de três grupos distintos, relacionando pelas distancias mais curtas no dendrograma, os isolados que

apresentaram uma maior similaridade quanto aos parâmetros de rendimento de conídios, mortalidade do inseto modelo *T. molitor* e mortalidade da praga-alvo *M. fimbriolata* (Figura 6). Os isolados ESALQ 1641 e ESALQ 4676 apresentaram valores muito diferentes dos demais isolados para duas das quatro variáveis e não formaram grupos fortemente suportados com os outros isolados. O isolado ESALQ 1641 apresentou uma das menores mortalidades a *T. molitor* e ESALQ 4676 apresentou um dos piores rendimentos de conídios.

Figura 6. Dendrograma formado por dez isolados de *Metarhizium anisopliae*; retângulos vermelhos indicam a formação de três grupos distintos considerando quatro variáveis respostas. As semelhanças entre os tratamentos são indicadas por valores de AU em vermelho e os retângulos vermelhos em torno de clusters são fortemente suportados por dados com AU P-valores > 0,90 (Bootstrap reamostragem = 1000 repetições)

4.1.6. Virulência de isolados de *Metarhizium anisopliae* a ninfas de *Mahanarva fimbriolata*

Não foi possível estimar a concentração necessária para matar 25% dos indivíduos (CL_{25}) ou a concentração letal mediana (CL_{50}) para estes isolados, uma vez que as curvas de mortalidade não seguiram uma tendência lógica de incremento em função do aumento da concentração.

Maiores percentuais de mortalidade foram observados nos insetos tratados com o isolado ESALQ 1641 ($\uparrow$ virulência). A mortalidade para as diferentes concentrações variou de $33,3 \pm 0,4\%$ na concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ a $63,3 \pm 0,4\%$, quando utilizada a concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹, sendo a única concentração com diferenciação estatística em relação a menor concentração (1×10^6 conídios.mL⁻¹) e ao tratamento controle ($\chi^2=13,535$; $df=5$; $P \leq 0,02$) [Log Rank (Mantel-Cox)] (Figura 7.A). O TL₅₀ obtido foi de $8,0 \pm 1,0$ (IC=6,0 – 10). As outras concentrações não diferiram entre si. As mortalidades confirmadas variaram de $23,3 \pm 0,3\%$ a $53,3 \pm 0,6\%$ não sendo observadas diferenças estatísticas ($\chi^2_{4,25}=29,4$; $P=0,17$) (Figura – 8).

As diferentes concentrações do isolado ESALQ 1037 ($\downarrow$ virulência) resultaram em mortalidade total de $13,3 \pm 0,2$ a $53,3 \pm 0,6\%$, sendo que 5×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹ causaram 53,3% e foram as concentrações que apresentaram diferença estatística ($\chi^2=18,157$; $df=5$; $P \leq 0,003$) em relação a menor concentração, de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ (13,3% mortalidade) de acordo com análise de sobrevivência (Figura 7.B). Na concentração de 5×10^7 conídios.mL⁻¹, a mortalidade total registrada foi de 46,7% e confirmada de 43,3%, não sendo observada diferença estatística dessa concentração em relação aos outros tratamentos. As mortalidades confirmadas variaram de $13,3 \pm 0,2$ a $46,7 \pm 0,7\%$, não sendo observadas diferenças significativas entre as médias de mortalidade.

As mortalidades causadas pelas diferentes concentrações do isolado ESALQ 1184 ($\uparrow$ produção de conídios) foram estatisticamente diferentes ($\chi^2=10,535$; $df=5$; $P \leq 0,06$) [Log Rank (Mantel-Cox) $p < 0.05$] (Figura 7.C). Observou-se mortalidade 10 dias após aplicação variando de $26,7 \pm 0,5$ a $53,3 \pm 0,6\%$ entre as diferentes concentrações, com diferença estatística apenas para a concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ em relação a concentração 10^7 conídios.mL⁻¹ e ao tratamento controle. A mortalidade confirmada variou entre 20 e 50%, não sendo observada diferenças estatísticas ($\chi^2_{4,25}=55,9$; $P=0,34$) (Figura 8) entre as concentrações.

ESALQ 1204, selecionado por apresentar as mais baixas produções de conídios, também foi o isolado com as menores médias de mortalidade total. Apenas na concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ observou-se diferença estatística ($\chi^2=7,845$; $df=5$; $P \leq 0,1$) (Figura 7.D) em relação ao controle.

As mortalidades confirmadas não diferiram entre as concentrações para cada isolado estudado ($\chi^2_{4,25}=39,6$; $P=0,41$) (Figura 8).

Figura 7. Sobrevivência de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* a $26,5 \pm 2^\circ \text{C}$, $80 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase 10 dias após a aplicação dos tratamentos (A) ESALQ 1641, (B) ESALQ 1037, (C) ESALQ 1184 e (D) ESALQ 1204 em diferentes concentrações. Letras vermelhas na frente das linhas indicam diferença entre os tratamentos [Log Rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$]

Figura 8. Mortalidade confirmada de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* a $26,5 \pm 2^\circ \text{C}$, $80 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase 10 dias após a aplicação de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Diferentes tratamentos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.1.7. Screening inicial com concentração única de *Beauveria bassiana* em ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B

No primeiro bioensaio, a aplicação dos isolados de *B. bassiana* sobre ninfas de *B. tabaci* Biótipo B, causaram redução de sobrevivência com diferença significativa entre os tratamentos ($\chi^2=1040,455$; $df=10$; $P<0,001$) (Tabela 6). A mortalidade após 10 dias variou entre 3,1 % no tratamento controle a 63,8% para o isolado ESALQ 4958. O maior percentual de mortalidade foi obtido com ESALQ 4958 [Log Rank (Mantel-Cox) $p<0.05$], sendo registrado um TL_{50} de $8 \pm 0,136$ (IC=7,636-8,364) e $63,8 \pm 4,2$ % de mortalidade confirmada.

No segundo bioensaio, também observou-se diferenças significativas entre os tratamentos ($\chi^2=557,545$; $df=10$; $P<0,001$) (Tabela 6), no entanto as mortalidades obtidas foram menores do que no bioensaio anterior. ESALQ 4958 foi o isolado com maior percentual de mortalidade, não sendo observada diferença significativa em relação ao isolado ESALQ 476. Não foi determinado o TL_{50} , pois nenhum tratamento atingiu sobrevivência inferior a 50%.

Tabela 5. Mortalidade confirmada, tempo letal mediano (TL) e intervalo de confiança (IC) de ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B após aplicação de diferentes isolados de *Beauveria bassiana*

Tratamento	1º experimento			2º experimento
	Mortalidade Confirmada (%) ¹	TL ₅₀ (dias)	IC (95%) (dias)	Mortalidade Confirmada (%) ¹
ESALQ 4958	63,8 ± 4,2 a	8 ± 0,2	7,6 - 8,4	43,1 ± 5,2 a
ESALQ 476	47,9 ± 4,2 b	-	-	41,5 ± 5,2 a
ESALQ 540	46,5 ± 5,3 b	-	-	28,1 ± 4,3 b
ESALQ 650	45,4 ± 6,4 bc	-	-	23,9 ± 3,0 bc
ESALQ 537	44,7 ± 3,0 bc	-	-	23,4 ± 4,6 bc
ESALQ PL63	43,2 ± 4,3 c	-	-	20,9 ± 2,7 c
ESALQ 749	39,5 ± 2,1 c	-	-	19,1 ± 2,7 c
ESALQ 543	39 ± 5,8 c	-	-	13,0 ± 3,4 c
ESALQ 447	12,8 ± 2,0 d	-	-	5,3 ± 1,4 de
ESALQ 1135	11,5 ± 1,5 d	-	-	3,1 ± 1,0 e
CONTROLE	-	-	-	-
$\chi^2 <$	0,01			0,01

¹ Médias de mortalidade obtidas em dois experimentos distintos;

Letras na frente das linhas indicam diferença entre os tratamentos [Log Rank (Mantel-Cox) p <0,05]

4.1.8. Análise de cluster para os isolados de *Beauveria bassiana*

A análise de cluster para os isolados de *B. bassiana* resultou na formação de dois grupos distintos (Figura 9). Três pares de isolados apresentaram maiores similaridades formando grupos fortemente suportados, são eles ESALQ 650 E ESALQ 749; ESALQ 476 E 4958; ESALQ 537 E ESALQ PL63. Os baixos valores de algumas das variáveis analisadas fizeram com que o isolado 447 apresentasse maior distanciamento no dendrograma.

Figura 9. Dendrograma formado por dez isolados de *Beauveria bassiana*, retângulos vermelhos indicam a formação de dois grupos distintos considerando quatro variáveis respostas. As semelhanças entre os tratamentos são indicadas por valores de AU em vermelho e os retângulos vermelhos em torno de clusters são fortemente suportados por dados com AU P-valores > 0,90 (Bootstrap reamostragem = 1000 repetições)

4.1.9. Virulência de isolados de *Beauveria bassiana* a ninfas de *Bemisia tabaci*

Biótipo B

Dos quatros isolados utilizados para o bioensaio com diferentes concentrações, apenas ESALQ 543 e ESALQ 4958 causaram mortalidade com percentual superior a 50%, sendo a CL_{50} determinada por análise de Probit, apenas para estes isolados (Tabela 6). Como a mortalidade foi determinada pela coloração avermelhada dos insetos, os valores registrados correspondem a mortalidade confirmada pelo fungo *B. bassiana*. ESALQ 543 ($\uparrow$ produção de conídios) apresentou diferença estatística entre as concentrações ($\chi^2=751,589$; $df=5$; $P<0,01$) (Figura 10.A), com uma mortalidade variando entre 11,2 e 72% para as diferentes concentrações, quando comparadas a 1,7% de mortalidade para o controle. As concentrações de 1×10^6 , 5×10^6 e 10^7 conídios.mL⁻¹ causaram respectivos 11,2, 18,8 e 35,1% de mortalidade. Nas duas maiores concentrações, não foi observado um incremento da mortalidade conforme o aumento da concentração, sendo registrado para a concentração de 5×10^7 conídios.mL⁻¹,

uma mortalidade de 72%, com um TL_{50} de $6 \pm 0,088$ (IC= 5,827-6,173), enquanto que para a concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹, a mortalidade registrada foi de 55,7% em um TL_{50} de $7 \pm 0,186$ (IC=6,635-7,365) e o valor estimado para a CL_{50} desse isolado foi de $2,49 \times 10^7$ (IC= $8,07 \times 10^6$ - $7,71 \times 10^7$) conídios.mL⁻¹.

ESALQ 604 (↓ produção de conídios) apresentou diferenças na mortalidade de ninfas de *B. tabaci* Biotipo B entre as concentrações utilizadas ($\chi^2=751,589$; df=5; $P<0,01$) (Figura 10.B). Entretanto, mesmo as mais altas concentrações causaram pouca redução na sobrevivência, com a mortalidade atingindo no máximo 20,7%. O isolado ESALQ 447 selecionado pela baixa virulência a *B. tabaci*, apresentou mortalidade de apenas 9,8%, na maior concentração (1×10^8 conídios.mL⁻¹). A mortalidade do controle foi de 1,7%, diferindo estatisticamente das concentrações do fungo ($\chi^2=26,563$; df=5; $P<0,01$) (Figura 10.D).

As curvas de sobrevivência das concentrações do isolado ESALQ 4958 (↑ virulência), apresentaram diferença estatística ($\chi^2=767,487$; df=5; $P<0,01$) (Figura 10.C), com mortalidade variando entre 13,5% e 65,5%. A 5×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹, obteve-se mortalidades de 64,6% e 65,5% e TL_{50} de $6 \pm 0,137$ (IC=5,732-6,268) e $6 \pm 0,113$ (IC=5,778-6,222) respectivamente. A CL_{50} estimada para este isolado foi de $2,99 \times 10^7$ (IC= $1,90 \times 10^7$ - $4,71 \times 10^7$) conídios.mL⁻¹.

Tabela 6. Parâmetros do modelo log-normal (Probit) e estimativas das concentrações letais medianas (CL_{50}) e intervalo de confiança (IC) para quatro isolados de *Beauveria bassiana* aplicados em ninfas de *Bemisia tabaci* Biotipo B

Isolados	N = total de insetos	Parâmetros do modelo				CL_{50} (conídios/mL)	IC 95% (conídios/mL)
		Slope (b)	c	d	e		
447	2023	-	-	-	-	ND ^{††}	ND
543*	2058	- 1.11	0,029	0,68	1619	$2,49 \times 10^7$	$8,07 \times 10^6$ - $7,71 \times 10^7$
604	1999	-	-	-	-	ND	ND
4958**	2264	- 0,68	0,02	NS	17028	$2,99 \times 10^7$	$1,90 \times 10^7$ - $4,71 \times 10^7$

* O modelo ajustado para o isolado 543 foi a função log-logística de quatro parâmetros;

** O modelo ajustado para o isolado 4958 foi a equação logística com três parâmetros onde o limite superior é igual a 1;

NS indica parâmetro não significativo; todos os outros parâmetros dos modelos foram significativos ($P < 0,05$);

ND^{††} Não determinada, pois não se atingiu 50% de mortalidade e nenhum modelo se encaixou para o conjunto de dados.

Figura 10. Sobrevivência de ninfas de *Bemisia tabaci* Biótipo B à $26,5 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 10\%$ e 12h de fotofase após 7 dias da aplicação dos tratamentos (A) ESALQ 543, (B) ESALQ 604, (C) ESALQ 4958 e (D) ESALQ 447 em diferentes concentrações. Letras vermelhas na frente das linhas indicam diferença entre os tratamentos [Log Rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$]

4.2. Discussão

A variação na produção de conídios entre os isolados de *M. anisopliae* e de *Beauveria* spp. foi expressiva. Por exemplo, o isolado ESALQ 1204 de *M. anisopliae* apresentou uma produção vinte e uma vezes menor (5% de rendimento), quando comparado ao isolado ESALQ 1184. A variação no rendimento de conídios de *Beauveria* spp. entre o isolado mais produtivo e o menos produtivo foi de vinte e cinco vezes (4% de rendimento).

Comparações entre os valores obtidos nesse estudo com estudos de outros autores são dificultadas pelos diferentes métodos de produção, tipo de arroz, teor de umidade do arroz no momento da extração, etc. De forma geral, os maiores valores obtidos com *M. anisopliae* são semelhantes aos obtidos por Rezende (2009) ($4,38 \pm 0,18 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹) e Freitas et al., (2014), que obtiveram $1,82 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹. A maior produção de conídios obtida de *Beauveria* spp foi $7,69 \pm 1,76 \times 10^9$ conídios.grama de arroz⁻¹, pouco superior aos valores relatados por Mascarin et al. (2013) que registraram um rendimento máximo aproximado de 5×10^9 conídios.grama de arroz⁻¹ e Rohde et al. (2006) $8,3 \times 10^8$ conídios.grama de arroz⁻¹.

Produção de conídios e virulência são importantes parâmetros a serem considerados na seleção de isolados promissores para o desenvolvimento de bioinseticidas. No entanto, encontrar um balanço para esses parâmetros pode representar uma maior viabilidade para um produto comercial, visto que, nem sempre o isolado mais produtivo proporciona os maiores índices de mortalidade.

Dentre os cinco isolados de *Beauveria* spp., (ESALQ 537, ESALQ 540, ESALQ 749, ESALQ 536 e ESALQ 1135) que causaram maior mortalidade ao inseto modelo, com valor superior a 94%, apenas um (ESALQ 749) está entre os cinco isolados mais produtivos. Por outro lado, ESALQ 543, um dos isolados mais produtivos, causou os maiores percentuais de mortalidade de *B. tabaci* (menor CL₅₀).

A dificuldade da manutenção da criação em laboratório de algumas pragas-chave, como é o caso de *M. fimbriolata*, direcionou esse estudo, primeiramente, para a utilização da espécie modelo *T. molitor* nos testes de virulência usando isolados previamente selecionados quanto ao rendimento de conídios. Os resultados indicaram que alguns isolados causam mortalidades elevadas tanto em *M. fimbriolata* quanto em *T. molitor*. Entretanto, não foi observada associação entre a virulência para as duas espécies de insetos, de forma que isolados selecionados pela maior virulência a *T. molitor* não serão necessariamente virulentos a *M. fimbriolata*. ESALQ 1641, selecionado entre os cinco isolados menos virulentos ao inseto modelo, apresentou os maiores percentuais de mortalidade à praga-alvo *M. fimbriolata*, com o menor TL₅₀ registrado, indicando que a virulência pode se manifestar diferentemente entre insetos de ordens distintas. Caso semelhante foi observado no trabalho de Rezende (2014), que testando a ação de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. sobre *T. molitor*, *Diatraea saccharalis* e *M. fimbriolata*, registrou virulência diferenciada para as ordens distintas em estudo.

Na análise dos parâmetros separadamente, o isolado ESALQ 1184 poderia ser selecionado pelo elevado rendimento de conídios e ESALQ 1641 pela alta mortalidade à praga-alvo *M. fimbriolata*. ESALQ 1641, entretanto, apresentou baixa mortalidade em *T. molitor*. Pela análise de cluster, levando-se em consideração o rendimento de conídios, mortalidade para o inseto modelo *T. molitor* e para a praga-alvo *M. fimbriolata*, apontaram três grupos que apresentaram valores semelhantes para as três características (ESALQ 425 e ESALQ 1037; ESALQ 867 e ESALQ 3732; ESALQ 1452 e ESALQ 1597). O isolado ESALQ 1116 destaca-se por apresentar valores elevados para os três parâmetros analisados.

Não foi possível confirmar a hipótese de que exista uma correlação negativa entre os parâmetros produção de conídios e virulência através dos bioensaios com isolados virulentos e não virulentos e produtivos e não produtivos. Os resultados reforçam a necessidade de uma análise conjunta destas variáveis, levando em consideração um peso diferencial para cada variável na seleção de isolados para utilização em produtos microbianos para o controle de pragas.

Entre todos os isolados de *B. bassiana* utilizados nos bioensaios com ninfas de *B. tabaci* biotipo B, apenas dois deles causaram mortalidade superiores a 50%. ESALQ 543 (selecionado nos testes pela ↑ produção de conídios) e ESALQ 4958 (selecionado por apresentar ↑ virulência nos ensaios de patogenicidade a *B. tabaci*). Nos estudos de seleção de isolados de *B. bassiana*, Quesada-Moraga et. al, (2006) utilizaram 25 isolados de *B. bassiana*, sendo registrado mortalidade superior a 50% apenas para quatro isolados. Os resultados obtidos pelo autor corroboram com os nossos resultados, salientando a importância da realização de um processo de seleção de isolados, uma vez que, a virulência para a praga-alvo deve ser um atributo intrínseco do isolado de interesse para o desenvolvimento de um micoinseticida. A mortalidade de insetos a fungos entomopatogênicos é influenciada entre outros fatores pela umidade relativa do ar, que nos nossos estudos foi de 70±10%, não atingindo valores acima de 90%. Este deve ter sido um dos motivos pelos níveis de mortalidade obtidos, pois em condições mais úmidas é possível obter-se mortalidades mais elevadas.

Quando foram considerados conjuntamente os parâmetros de rendimento de conídios, mortalidade para o inseto modelo *T. molitor* e para a praga-alvo *B. tabaci* Biotipo B, pela análise de cluster observou-se a separação de dois grupos distintos de *B. bassiana*. Esse tipo de análise não aponta determinado grupo como sendo melhor ou pior, apenas relaciona em um dendrograma, os isolados que apresentaram semelhança nos parâmetros avaliados. Contudo, analisando individualmente as características que levaram à formação de grupos dos

isolados, pode-se identificar aquele com as características desejáveis. Através destas análises pode-se sugerir que ESALQ 540 (*B. bassiana*) e ESALQ 1116 (*M. anisopliae*) foram isolados que se destacaram nos parâmetros de interesse. Porém, as análises de cluster poderiam se tornar ainda mais interessante com a ampliação do número de parâmetros avaliados, utilizando também, como por exemplo, resistência contra a radiação UV, esporulação sobre cadáveres, tempo de prateleira, entre outros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foram levantadas duas hipóteses. A primeira hipótese de que existe correlação negativa entre os parâmetros rendimento de conídios e virulência não foi confirmada pelos bioensaios. Por exemplo, o isolado ESALQ 749 (*B. bassiana*) foi um dos cinco isolados com maior rendimento de conídios, maior mortalidade ao inseto modelo *T. molitor* e a praga-alvo *B. tabaci* Biótipo B. A outra hipótese levantada foi de que um screening inicial de isolados fúngicos poderia ser conduzido com o inseto modelo *T. molitor* e posteriormente confirmada a virulência destes aos insetos alvo. O que se busca nesta estratégia é encontrar isolados que sejam eficientes contra uma ampla gama de hospedeiros. Os nossos resultados revelaram que os isolados selecionados por apresentarem as menores médias de mortalidade ao inseto modelo *T. molitor*, foram os mais virulentos a *M. fimbriolata* e *B. tabaci* Biótipo B, respectivamente. Por outro lado, alguns isolados como, por exemplo, ESALQ 540 (*B. bassiana*) e ESALQ 1116 (*M. anisopliae*) apresentaram valores elevados de mortalidade para *T. molitor* e para a praga alvo.

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de uma análise conjunta das variáveis com um peso diferenciado para cada uma delas, na seleção de isolados para o desenvolvimento de biopesticidas. Mais importante ainda, é necessário integrar uma análise econômica, calculando o custo de conídios necessários para matar uma determinada quantidade de insetos. Isolados que apresentam elevada produção de conídios mas apresentam elevada CL_{50} podem ainda ser economicamente vantajosos em relação a isolados que são muito virulentos mas produzem poucos conídios.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B., PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). . **Controle microbiano de insetos**. 2^a edição ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 845–867.
- ALVES, S. B., LECUNA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). . **Controle microbiano de insetos**. 2^a edição ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 97–163.
- ALVES, S. B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 77–86, 1992.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2^a Edição ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. p. 21–37.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). . **Controle microbiano de insetos**. 2^a edição ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b. p. 289–370.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Eds.). . **Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. 1^a ed. Piracicaba - SP: FEALQ, 2008a. p. 69-104.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). . **Controle microbiano de insetos**. 2^a ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 917 - 956.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; SANTOS, A. S.; MACHADO, L. A.; ALVES, S. B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata*. **Arq. Inst. Biol**, v. 70, n. 3, p. 309–314, 2003.
- BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. **Science**, v. 336, n. 6088, p. 1576–1577, 2012.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512–530, 2009.
- BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. **BioControl**, v. 55, p. 7–16, 2010.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 323–342, 2006.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira:** cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2016. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, n. 4, p. 387–400, 2001.
- FARIA, M.; WRIGHT, S. P. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop Protection**, v. 20, p. 767–778, 2001.
- FARIA, M. R. DE; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.
- FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, v. 61, p. 427–440, 2015.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual review of phytopathology**, v. 43, p. 337–59, 2005.
- FREITAS, A. F.; LOUREIRO, E. S.; ALMEIDA, M. E. B.; PESSOA, L. G. A. Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch .) Sorok . (Ascomycota : Clavicipitaceae) cultivados em arroz. **Arq. Inst. Biol**, v. 81, n. 1, p. 75–78, 2014.
- GOETTEL, M. S.; EILENBERG, J.; GLARE, T. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. In: LAURENCE, I. G.; SARJEET, S. G. (Eds.). **Insect Control: Biological and Synthetic Agents**. 1^a ed. ELSEVIER, 2010. p. 387–437.
- HESKETH, H.; ROY, H. E.; EILENBERG, J.; PELL, J. K.; HAILS, R. S. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of Insects. **BioControl**, v. 55, p. 55–73, 2010.
- IBM CORP. **IBM SPSS statistics for windows**: version 22.0. Armonk, 2013.
- INGLIS, G. D., GOETTEL, M. S., BUTT, T. M., STRASSER, H. et al. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 23–70.
- JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 180–187, 1997.
- JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, p. 129–145, 2010.

- JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, p. 159–185, 2010.
- JARONSKI, S. T. Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Eds.). . **Mass Production of Beneficial Organisms**. Elsevier Inc., 2014. p. 357–413.
- JELIHOVSCHI, E. G.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. . B. ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. **Tend. Mat. Apl. Comput.**, v. 15, n. 1, p. 3–17, 2014.
- KASSA, A. BROWNBRIDGE, M.; PARKER, B. L.; SKINNER, M.; GOULI, V.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 112, p. 583–591, 2008.
- LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.
- LEITE, L. G., BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2003. 92 p.
- LOPES, R. B.; MICHEREFF-FILHO, M.; TIGANO, M. S.; NEVES, P. M. O. J.; LOPEZ, E. L.; FANCELLI, M.; SILVA, J. P. Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 64, n. 2, p. 201–208, 2011.
- LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, p. 19–29, 2005.
- LOURENÇÃO, A. L.; KRAUSE-SAKATE, R.; VALLE, G. E. Mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B. In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. **Pragas introduzidas no Brasil insetos e ácaros**. Piracicaba: FEALQ, 2015. Cap. 39 p. 682-702.
- MAPA/Agrofit. 2016. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. Acesso em: 12 jan. 2017.
- MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; DELALIBERA JR, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, v. 66, p. 209–218, 2013.
- MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 177, p. 6–26, 2016.
- MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoínseticidas E Micoacaricidas No Brasil: Como Estamos Após Quatro Décadas? **Arq. Inst. Biol**, v. 76, n. 4, p. 769–779, 2009.

- OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 1–15, 2013.
- PARRA, J. Biological control in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 345–355, 2014.
- QUESADA-MORAGA, E.; MARANHÃO, E. A. A.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements and toxicogenic activity. **Biological Control**, v. 36, p. 274–287, 2006.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language enviromental for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em 11 jul. 2016.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language enviromental for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2015. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em 22 nov. 2016.
- REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic , entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055–1073, 2011.
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84–98, 2005.
- REZENDE, J. M. **Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**. 2009. 112p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- REZENDE, J. M. **Diversidade filogenética e expressão de genes de virulência de *Metarhizium* com ênfase em isolados brasileiros associados a cultura da cana-de-açúcar**. 2014. 139p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- REZENDE, J. M.; ZANARDO, A. B. R.; LOPES, M. da SILVA.; DELALIBERA JR, I.; REHNER, S. A. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl**, v. 60, n. 4, p. 495–505, 2015.
- RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

- 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**, v. 35, n. 2, p. 231–240, 2006.
- ROY, H. E.; STEINKRAUS, D. C.; EILENBERG, J.; HAJEK, A. E.; PELL, J. K. Bizarre interactions and andgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 331–357, 2006.
- SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 101–107, 2012.
- SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusar*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 35, n. 3, p. 288–293, 2013.
- SCHOLTE, E.-J.; KNOLS, B. G. J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of insect science**, v. 4, n. 19, p. 24, 2004.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; FUXA, J. R.; LACEY, L. A.; ONSTAD, D. W.; KAYA, H. K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 1–7, 2005.
- SUZUKI, R.; SHIMODAIRA. pvclust: Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling. **R** package version 2.0-0, 2015. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=pvclust>>. Acesso em 19 jan. 2017.
- VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 277–279, 2008.
- VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M. A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N. K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B. H.; PELL, J. K.; RANGEL, D. E. N.; ROY, H. E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, p. 149–159, 2009.
- YEO, H.; PELL, J. K.; ALDERSON, P. G.; CLARK, S. J.; PYE, B. J. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. **Pest Management Science**, v. 59, p. 156–165, 2003.
- ZANARDO, A. B. R. **Abundância de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales e diversidade genética de *Metarhizium* spp. isolados de amostras de solo de áreas representativas de cinco biomas brasileiros**. 2015. 154p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 5/6 p. 553 - 596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879 - 920, 2007b.

ANEXOS

ANEXO A. Descrição dos isolados selecionados de *Beauveria* spp. que serão utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

(continua)

Código do isolado	Local de coleta	Origem/hospedeiro
ESALQ 196	Ipojuca-PE	Lepidoptera: Crambidae
ESALQ 252	Piracicaba-SP	Coleoptera: Curculionidae
ESALQ 268	Pernambuco	Lepidoptera: Crambidae
ESALQ 341	Iracemápolis-SP	Lepidoptera: Crambidae
ESALQ 353 [†]	Piracicaba-SP	Hemiptera: Pentatomidae
ESALQ 428	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 434 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 446	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 447 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 457 [†]	Desconhecido	Hemiptera: Pentatomidae
ESALQ 468	Volta Redonda-RJ	Hymenoptera: Apidae
ESALQ 476 [†]	Piracicaba-SP	Coleoptera: Curculionidae
ESALQ 535 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 536 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 537 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 538	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 539	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 540 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 541	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 543 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 544	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 546	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 547 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 548 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 561	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 562	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 564	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 565	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 567	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 569 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 570 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 572 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 574 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 579	Piracicaba-SP	Coleoptera: Scarabaeidae
ESALQ 596 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 603 [†]	Cuiabá-MT	solo
ESALQ 604 [†]	Cuiabá-MT	solo
ESALQ 605	Cuiabá-MT	solo
ESALQ 611 [†]	Cuiabá-MT	solo
ESALQ 616 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 617	Goiânia-GO	Hemiptera: Pentatomidae
ESALQ 618 [†]	desconhecido	Hemiptera: Pentatomidae

ANEXO A - Descrição dos isolados selecionados de *Beauveria* spp. que serão utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

(continuação)

Código do isolado	Local de coleta	Origem/hospedeiro
ESALQ 619 [†]	desconhecido	Hemiptera: Pentatomidae
ESALQ 637	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 642 [†]	Anhembi-SP	Orthoptera: Gryllotalpidae
ESALQ 644 [†]	Lavras-MG	solo
ESALQ 645	Alambari-SP	solo
ESALQ 646	Alambari-SP	solo
ESALQ 647 [†]	Alambari-SP	solo
ESALQ 650 [†]	Alambari	solo
ESALQ 651	Amparo-SP	solo
ESALQ 665	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 666	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 669	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 674	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 677	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 688 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 695	Londrina-PR	Coleoptera: Curculionidae
ESALQ 704	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 722	Cuiabá-MT	Lepidoptera: Crambidae
ESALQ 738	Vargem Grande do Sul-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 739 [†]	Vargem Grande do Sul-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 743	Vargem Grande do Sul-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 749 [†]	Vargem Grande do Sul-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 752 [†]	Vargem Grande do Sul-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 757	Vargem Grande do Sul-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 759	São Pedro de Alcântara-SC	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 760	Piracicaba-SP	Blattaria: Isoptera
ESALQ 781	Desconhecido	solo
ESALQ 782	Desconhecido	solo
ESALQ 784	Desconhecido	solo
ESALQ 823	Cuiabá-MT	solo
ESALQ 834 [†]	Águas de Lindóia-SP	desconhecido
ESALQ 843 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 846 [†]	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 853	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 879 [†]	Colônia-Uruguaí	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 892	Uruguaí	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 899	Rio Grande do Sul	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 902	Rio Grande do Sul	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 957	Piracicaba-SP	Hymenoptera: Formicidae
ESALQ 986	Piracicaba-SP	Aracnideo: carrapato
ESALQ 1054 [†]	Londrina-PR	Solo
ESALQ 1074	Piracicaba-SP	Lepidoptera: Crambidae
ESALQ 1075 [†]	Arapongas-PR	solo
ESALQ 1081	Londrina-PR	solo
ESALQ 1135 [†]	Rancharia-SP	solo
ESALQ 1173	Jaboticabal-SP	solo

ANEXO A - Descrição dos isolados selecionados de *Beauveria* spp. que serão utilizados neste estudo, atualmente depositados na Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

(conclusão)

Código do isolado	Local de coleta	Origem/hospedeiro
ESALQ1432 [†]	Piraicicaba-SP	Bagaço de cana em decomposição
ESALQ 2272 [†]	Sinop-MT	solo
ESALQ 4951 [†]	Sinop-MT	solo
ESALQ 4952 [†]	Sinop-MT	solo
ESALQ 4953 [†]	Delmiro Gouveia-AL	solo
ESALQ 4954 [†]	Delmiro Gouveia-AL	solo
ESALQ 4955 [†]	Rio Verde-GO	solo
ESALQ 4956 [†]	Sinop-MT	solo
ESALQ 4957 [†]	Bagé-RS	solo
ESALQ 4958 [†]	Sinop-MT	solo
ESALQ PL61 [†]	Espirito Santo	Coleoptera: Curculionidae
ESALQ PL63 [†]	Piracicaba-SP	Hymenoptera: Formicidae

[†] Isolados de *Beauveria* spp. selecionados para o teste de rendimento produtivo

ANEXO B. Descrição dos isolados selecionados de *Metarhizium* spp. que serão utilizados no estudo, atualmente depositados no banco de entomopatógenos “Prof. Sergio Batista Alves” da ESALQ/USP – Piracicaba-SP

(continua)

Espécie	Código do isolado	Local de coleta	Origem/hospedeiro
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 26	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 43 [†]	Fleixeiros-AL	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 49 [†]	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 319	Goiânia-PE	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 333 [†]	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 334	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 353 [†]	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 374	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 385	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 412 [†]	Iguapé-SP	Blattaria: Blaberidae
	ESALQ 425 [†]	Campinas-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 798	Cuiabá-MT	Hymenoptera: Formicidae
	ESALQ 816 [†]	Piracicaba-SP	solo
	ESALQ 818	Piracicaba-SP	solo
	ESALQ 860 [†]	Piracicaba-SP	Coleoptera: Scarabaeidae
	ESALQ 865 [†]	Goiânia-GO	Hemiptera
	ESALQ 866 [†]	Goiânia-GO	Hymenoptera: Formicidae
	ESALQ 867 [†]	Goiânia-GO	Hymenoptera: Formicidae
	ESALQ 935	Itabuna-BA	Lepidoptera: Crambidae
	ESALQ 959 [†]	Rio de Janeiro-RJ	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1022 [†]	Piracicaba-SP	Hymenoptera: Tiphidae
	ESALQ 1037 [†]	Porto Alegre-RS	Hymenoptera: Formicidae
	ESALQ 1076 [†]	Arapongas-PR	solo
	ESALQ 1097 [†]	Lavras-MG	solo
	ESALQ 1104 [†]	São João do Piauí-PI	solo
	ESALQ 1116 [†]	Piracicaba -SP	Coleoptera: Scarabaeidae
	ESALQ 1175 [†]	Córrego Rico-SP	solo
	ESALQ 1184 [†]	Corumbá-MS	solo
	ESALQ 1204 [†]	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1247	Bebedouro-SP	solo
	ESALQ 1256 [†]	Concórdia-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1387 [†]	Jaú-SP	Hymenoptera: Formicidae
	ESALQ 1405 [†]	Palmas-TO	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1444 [†]	Nova Europa-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1452 [†]	Água Comprida-MG	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1464	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1473	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1595 [†]	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1596	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1597 [†]	Ourinhos-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1598	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae

ANEXO B - Descrição dos isolados selecionados de *Metarhizium* spp. que serão utilizados no estudo, atualmente depositados no banco de entomopatógenos “Prof. Sergio Batista Alves” da ESALQ/USP – Piracicaba-SP

(continuação)

Espécie	Código do isolado	Local de coleta	Origem/hospedeiro
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 1599	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1600	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1601	Boa Vista-GO	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1603	Piracicaba-SP	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1606 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1607 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1610 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1613 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1614 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1616 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1640	Pernambuco-PE	Lepidoptera: Crambidae
	ESALQ 1641 [†]	Boca da Mata-AL	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1642 [†]	Rio de Janeiro-RJ	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1643 [†]	Desconhecido	-
	ESALQ 1644 [†]	Iturama-MG	Hemiptera: Cercopidae
	ESALQ 1612	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1615	Sinop-MT	solo
	ESALQ 3732 [†]	Teotônio Vilela-AL	solo
	ESALQ 4676 [†]	Teotônio Vilela-AL	solo
	ESALQ 4844 [†]	Sinop-MT	solo
<i>Metarhizium robertsii</i>	ESALQ 1426	Londrina-PR	solo
	ESALQ 1631	Bagé-RS	solo
	ESALQ 1632	Bagé-RS	solo
	ESALQ 1633	Sinop-MT	solo
	ESALQ 1634 [†]	Delmiro Gouveia-AL	solo
	ESALQ 1635 [†]	Delmiro Gouveia-AL	solo
	ESALQ 4622	Sinop-MT	solo
<i>Metarhizium</i> sp. indet.	ESALQ 2627	Delmiro Gouveia-AL	solo
	ESALQ 2747	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 2971	Teotônio Vilela-AL	solo
	ESALQ 2972	Teotônio Vilela-AL	solo
	ESALQ 2977	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 2978	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 2983	Teotônio Vilela-AL	solo
	ESALQ 2997	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 2998	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 2999	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 3001	Rio Verde-GO	solo
	ESALQ 4888	Teotônio Vilela-AL	solo

ANEXO B - Descrição dos isolados selecionados de *Metarhizium* spp. que serão utilizados no estudo, atualmente depositados no banco de entomopatógenos “Prof. Sergio Batista Alves” da ESALQ/USP – Piracicaba-SP

(conclusão)

Espécie	Código do isolado	Local de coleta	Origem/hospedeiro
<i>Metarhizium</i> sp. indet.	ESALQ 4922 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 4923	Sinop-MT	solo
	ESALQ 4934 [†]	Sinop-MT	solo
	ESALQ 5234 [†]	Botucatu-SP	solo
	ESALQ 5239 [†]	Uruçuca-BA	solo
	ESALQ 5311 [†]	Piracicaba-SP	solo
	GA14 I*	Bagé-RS	solo
	GA22 II*	Bagé-RS	solo
	GC11 III*	Sinop-MT	solo
	TA2 VIII*	Bagé-RS	solo
	TA24 III*	Bagé-RS	solo
	TA8 VII*	Bagé-RS	solo
	TB3 VII*	Sinop-MT	solo
	TC22 VII*	Sinop-MT	solo
	TC9 I*	Sinop-MT	solo
	TE13 III*	Delmiro Gouveia-AL	solo
	TE5 V*	Delmiro Gouveia-AL	solo
	TE8 III*	Delmiro Gouveia-AL	solo
	TH7 III* [†]	Sinop-MT	solo
	TJR.IX* [†]	Rio Verde-GO	solo

* Isolados depositados na coleção de entomopatógenos “Prof. Sergio Batista Alves” da ESALQ/USP – Piracicaba-SP que ainda não foram registrados, portanto, não receberam nº ESALQ;

[†] Isolados de *Metarhizium* spp. selecionados para o teste de rendimento produtivo