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

Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa

Víctor Manuel Arévalo Rojas

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

**Piracicaba
2015**

Víctor Manuel Arévalo Rojas
Engenheiro Agrônomo

Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Arévalo Rojas, Víctor Manuel

Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa / Víctor Manuel Arévalo Rojas. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

99 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle biológico 2. Micoinseticidas 3. Fermentação sólida 4. Radiação ultravioleta-B
5. Termotolerância I. Título

CDD 589.23
A683c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Víctor Eduardo Arévalo Diaz e Rina Rojas Amasifuén, por todo o amor, carinho e paciência, e para meus dois amores Pamela Neyra Segil e meu filho André Santiago Arévalo Neyra, pelo amor, paciência e compreensão, eu dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,
Departamento de Entomologia e Acarologia, pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pela orientação, confiança, amizade, paciência e respeito
demonstrados durante os trabalhos.

À Dra. Celeste Paola D'Alessandro pela amizade e ensinamentos.

À Bióloga Solange Aparecida Vieira Barros pela amizade e apoio durante a realização dos
trabalhos.

A todos os colegas do laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos: Giovani
Coura, Marcos Conceschi, Cleane Sousa, Livia Alves, Elisa Sousa, Rafaela Prado, Kauana
Abati, Luiz Mota, Giuliano Pauli, Vanessa Duarte, Polyane dos Santos, Ana Beatriz Zanardo,
Ana Carolina Oliveira, Natasha Iwanicki e Thiago de Castro pela ajuda e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos ensinamentos.

A todos os integrantes de minha família: Pamela Neyra e André Arévalo, em especial os meus
pais, Eduardo Arévalo e Rina Rojas, e minhas irmãs Dorita e Basita.

Aos alunos de pós-graduação da Estatística: Christopher Silva, Maíra Fatoreto e Vinícius
Menarin pelas análises estatísticas realizadas neste trabalho.

Ao Programa Nacional de becas del Perú (Pronabec) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Descrição dos fungos entomopatogênicos.....	13
1.2 Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas.....	16
1.3 Produção de conídios de fungos entomopatogênicos.....	18
1.4 Tolerância de fungos entomopatogênicos a condições climáticas adversas (radiação UV-B e temperatura elevada).....	20
1.5 Formulações com fungos entomopatogênicos.....	25
1.6 Características gerais de <i>I. fumosorosea</i>	29
1.7 Controle de pragas com <i>I. fumosorosea</i>	31
1.8 Objetivos.....	35
Referências.....	35
2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Isaria fumosorosea</i> QUANTO AOS PARÂMETROS PRODUÇÃO DE CONÍDIOS, EFEITOS DA RADIAÇÃO UV-B E TEMPERATURA ALTA.....	49
Resumo.....	49
Abstract.....	49
2.1 Introdução.....	50
2.2 Material e Métodos.....	51
2.2.1 Seleção de isolados de <i>I. fumosorosea</i> em meio de cultura.....	51
2.2.2 Produção de <i>I. fumosorosea</i> por fermentação sólida em frascos de vidro.....	52
2.2.3 Produção de <i>I. fumosorosea</i> na fermentação sólida em sacolas plásticas.....	53
2.2.4 Teste de efeitos aos raios ultravioletas.....	54
2.2.5 Teste de efeito da temperatura a 45°C.....	55
2.2.6 Análises estatísticas.....	57
2.3 Resultados.....	57
2.3.1 Seleção de isolados de <i>I. fumosorosea</i> quanto aos parâmetros produção de conídios, efeitos da radiação UV-B e temperatura alta.....	57
2.3.1.1 Seleção de isolados de <i>I. fumosorosea</i> em meio de cultura.....	57
2.3.1.2 Produção do fungo na fermentação sólida em frascos de vidro.....	59
2.3.1.3 Produção do fungo na fermentação sólida em sacolas plásticas.....	61

2.3.1.4 Efeitos da radiação ultravioleta B na germinação dos conídios de <i>I. fumosorosea</i>	61
2.3.1.5 Teste de termotolerância a 45°C.....	63
2.4 Discussão.....	65
2.5 Considerações Finais.....	69
Referências.....	70
3 PERSISTÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Isaria fumosorosea</i> EM FORMULAÇÕES DO TIPO DISPERSÃO OLEOSA.....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	75
3.1 Introdução.....	76
3.2 Material e métodos.....	77
3.2.1 Extração e secagem dos conídios de <i>I. fumosorosea</i> ESALQ-1296.....	77
3.2.2 Relação entre a umidade dos conídios de <i>I. fumosorosea</i> e a sobrevivência.....	78
3.2.3 Sobrevivência de conídios de <i>I. fumosorosea</i> em formulações do tipo dispersão oleosa.....	79
3.2.4 Análises estatísticas.....	81
3.3 Resultados.....	81
3.3.1 Relação entre o teor de umidade e a sobrevivência de conídios de <i>I.</i> <i>fumosorosea</i>	81
3.3.2 Sobrevivência de conídios de <i>I. fumosorosea</i> em formulações do tipo dispersão oleosa.....	83
3.4 Discussão.....	86
3.5 Considerações Finais.....	88
Referências.....	88
ANEXO.....	93

RESUMO

Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa

O fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) é encontrado comumente nos solos e infectando diversas espécies de artrópodes. Bioprodutos à base de *I. fumosorosea* são utilizados principalmente na América do Norte e Europa para o controle de mosca-branca, pulgões e trips. Entretanto, no Brasil ainda não existe nenhum produto registrado à base deste patógeno. O objetivo deste trabalho foi estabelecer parâmetros para a seleção de isolados promissores para o desenvolvimento de um biopesticida à base de *I. fumosorosea*. Os isolados foram avaliados em três etapas sequenciais: esporulação em meio de cultura artificial, fermentação em grão de arroz e tolerância à radiação ultravioleta B e temperatura alta. A partir de uma coleção de 172 isolados de *I. fumosorosea* provenientes do solo e insetos de diferentes biomas do Brasil, foram escolhidos 72 isolados por apresentar visualmente maior esporulação das colônias em SDYA (Sabouraud-dextrose-extrato de levedura-ágar). Posteriormente, esses isolados foram utilizados para a fermentação sólida em garrafas de vidro contendo 50 gramas de arroz parboilizado. Destes, 14 isolados foram avaliados quanto à produção de conídios em sacos de polipropileno contendo arroz parboilizado e quanto aos efeitos da exposição à radiação ultravioleta B (UV-B) por 0, 2, 4, 6 e 8 horas e temperatura de 45°C por 0, 30, 60 e 90 minutos. Os isolados ESALQ-4556 e ESALQ-4778 apresentaram os maiores rendimentos de conídios em garrafas de vidro ($4,65$ e $4,40 \times 10^9$ conídios/g arroz seco) e em sacos de polipropileno ($3,96$ e $3,25 \times 10^9$ conídios/g arroz seco). Os isolados ESALQ-1296 e ESALQ-3415 apresentaram maior tolerância aos efeitos da radiação ultravioleta-B e aquecimento. Para a elaboração de uma formulação do tipo dispersão oleosa foi ajustado o ponto de secagem dos conídios para incrementar o tempo de prateleira e avaliadas diferentes misturas do adjuvante KBRA_{adj} e óleos vegetais. Foram utilizados conídios do isolado ESALQ-1296 produzidos em arroz com atividade de água (a_w) de 0,527 e conídios secos com $a_w = 0,410$; 0,248 e 0,182 adicionados ao adjuvante KBRA_{adj} puro. A sobrevivência dos conídios mais secos foi maior do que de conídios úmidos. O adjuvante promoveu proteção aos conídios úmidos, apresentando viabilidades significativamente maiores do que conídios úmidos sem adjuvante em todos os períodos de armazenamento. Conídios com $a_w = 0,182$ sem adjuvante apresentaram as maiores viabilidades (70,3%) após 60 dias de armazenamento. Para desenvolver uma formulação do tipo dispersão oleosa foram testadas misturas de 25% de óleo de soja ou canola + 75% do adjuvante KBRA_{adj} com ou sem sílica gel, em conídios úmidos ($a_w = 0,546$ e UR= 13,18%) ou secos ($a_w = 0,175$ e UR= 4,42%). A adição de 25% de óleo vegetal ou sílica gel na formulação não contribuiu para o incremento do período de prateleira da formulação. A viabilidade dos conídios nas diferentes formulações após 90 dias de armazenamento variou de $42,3 \pm 0,03\%$ a $56,9 \pm 0,01\%$. Estudos futuros deverão ser conduzidos para incrementar o período de prateleira e avaliar a virulência destas formulações para o controle de pragas, especialmente mosca-branca e psíldeo-dos-citros.

Palavras-chave: Controle biológico, MicoInseticidas, Fermentação sólida, Radiação ultravioleta-B; Termotolerância

ABSTRACT

Characterization of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* for production of conidia, effects of ultraviolet-B radiation, high temperature and the persistence in oil dispersion formulation

The entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) is commonly found in soil and infecting several species of arthropods. *I. fumosorosea* based bioproducts are mainly used in North America and Europe for the control of whitefly, aphids and thrips. However, in Brazil there is still no registered product based on this pathogen. The objective of this study was to establish parameters for the selection of promising isolates for developing *I. fumosorosea* based biopesticides. The isolates were evaluated in three sequential steps: sporulation on artificial medium, sporulation on rice grains, tolerance to ultraviolet-B radiation and high temperature. From a collection of 172 *I. fumosorosea* isolates from soil and insects of different Brazilian biomes, 72 isolates were chosen based on visual observations of higher sporulation of colonies in SDYA (Sabouraud-dextrose-yeast extract-agar). Later, these isolates were used for the solid fermentation in glass bottles containing 50 g of parboiled rice. Of these, 14 strains were evaluated for conidia production in polypropylene bags containing parboiled rice and the effects of exposure to ultraviolet-B (UV-B) for 0, 2, 4, 6 and 8 hours and 45°C for 0, 30, 60 and 90 minutes. The ESALQ-4556 and ESALQ-4778 isolates showed the highest spore yields in glass bottles (4.65 and 4.40×10^9 spores/g dry rice) and in polypropylene bags (3.96 and 3.25×10^9 spores/g dry rice). The ESALQ-1296 and ESALQ-3415 isolates showed a higher tolerance to the UV-B radiation and heating. For the development of oil dispersion formulations, the drying point of the conidia was adjusted to increase the shelf-life in different mixtures of the KBRAdj adjuvant and vegetable oils. Conidia produced on rice from the isolate ESALQ-1296 without drying with water activity (a_w) = 0.527 and dried conidia with a_w of 0.410; 0.248 and 0.182 added to the pure adjuvant. Survival of the dryer conidia was greater than humid conidia. The adjuvant provided protection to humid conidia, with significantly higher viability than conidia without drying and without adjuvant at all storage periods. Conidia with a_w = 0.182 without adjuvant showed the highest viability (70.3%) after 60 days of storage. To develop an oil dispersion type formulation it were tested mixtures with 25% of soy or canola oil + 75% of KBRAdj adjuvant with or without silica gel using humid (a_w = 0.546 and RH = 13.18%) or dried conidia (a_w = 0.175 and RH = 4.42%). Addition of 25% of vegetable oil or silica gel in the formulation did not contribute to the increase of the shelf-life. The conidia viability in the different formulations after 90 days of storage ranged from $42.3\% \pm 0.03\%$ to 56.9 ± 0.01 . Future studies must be conducted to increase the shelf- life and to assess the virulence of these formulations for pest control, particularly whitefly and the citrus psyllid.

Keywords: Biological control; Mycopesticides; Solid fermentation; Ultraviolet-B radiation; Thermotolerance

1 INTRODUÇÃO

1.1 Descrição dos fungos entomopatogênicos

Os fungos são popularmente conhecidos por diferentes nomes no mundo inteiro, mas é um grupo bastante numeroso, formado por cerca de 200.000 espécies espalhadas por praticamente qualquer tipo de ambiente. Podem ser organismo de tamanho e forma variáveis, unicelulares, ou constituídos por um conjunto filamentosos de micélios, por sua vez composto de células denominadas hifas, com parede constituída quimicamente de quitina e/ou celulose, além de outros compostos. Um grupo de fungos que infectam e matam seus hospedeiros (insetos) são chamados fungos entomopatogênicos (ALVES, 1998a; SINGKARAVANIT et al., 2010). A principal via de entrada do fungo entomopatogênico é através de contato com o tegumento do inseto (HOLDER; KEYHANI, 2005).

Os fungos do filo Ascomycota são caracterizados por hifas septadas que se diferenciam em células conidiogênicas, conidióforos ou fiálides e os conídios, que são estruturas de reprodução assexuada. As células conidiogênicas emergem do micélio aéreo e são responsáveis pela produção dos conídios. A dispersão dessas estruturas é de forma passiva, pelo vento, chuva ou hospedeiros alternativos. Dentro do filo Ascomycota, a ordem Hypocreales, se divide em três famílias de fungos entomopatogênicos: A família Cordycipitaceae que apresentam os gêneros de maior importância agrícola, tais como *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, e a família Clavicipitaceae onde se encontram os gêneros: *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Pochonia* e a família Ophicordycipitaceae com os gêneros mais importantes: *Hirsutella* e *Syngliocladium* (HUMBER, 2012).

Os fungos do filo Entomophthoromycota são divididos em diversas classes, dentre elas, Basidiobolimyces, Neozygitomyces, Entomophthoromyces. Fungos deste filo são caracterizados por apresentar hifas não septadas, as quais são reproduzidas assexuadamente ou sexuadamente (ALVES, 1998a). A reprodução sexuada ocorre através da formação de conídios primários, que germinam e penetram no inseto e pode causar conídios secundário e terciário. Dentro do inseto produz corpos de hifas, e secas condições não são favoráveis, alguns podem produzir esporos de resistência. Os principais gêneros pertencentes ao filo Entomophthoromycota são: *Basidiobolus*, *Conidiobolus*, *Batkoa*, *Entomophthora*, *Zoophthora*; *Neozygites*, *Massospora*, *Pandora*. (GRYGANSKI et al., 2013; HUMBER, 2012).

Os fungos usualmente aderem à superfície externa do corpo dos insetos na forma de esporos microscópicos (geralmente esporos assexuais, mitospóricos, também chamados conídios), estes esporos germinam iniciando a expansão do mesmo, que é favorecida por uma umidade elevada (70% por 14h), sendo a germinação desencadeada por mensageiros que são geralmente hidratos de carbono presentes nas proteínas da cutícula de insetos (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1995; 1996). A hidratação do esporo é favorecida pela ação antidessecante da tampa mucilaginosa; também funciona como um escudo na presença de polifenóis tóxicos e enzimas segregadas pelo sistema imunológico do inseto. Os conídios dos fungos têm elevado teor de aminopeptidases e hidrofobina, que favorecem a ação de enzimas extracelulares na cutícula de insetos. No entanto, esterases e proteases têm sido encontradas em conídios não germinados, sugerindo modificação da superfície cuticular antes da germinação, uma vez que durante a hidratação de esporos não apenas absorve água, mas também nutrientes (JONES, 1994; KERSHAW; TALBOT, 1998; DIAZ et al., 2006).

Após o inchaço dos esporos tem lugar a formação do tubo germinativo pelo processo de polarização do crescimento apical de fungos, que estimula a síntese da parede celular. H^+ e Ca^{2+} entram na extremidade da hifa por um mecanismo de transporte passivo e são acionados por mecanismos dependentes de energia. Esse fluxo transcelular permanece constante e mantém o desenvolvimento do tubo germinativo e formação de apressórios. O tubo germinativo reconhece a superfície do corpo do inseto, localizando sítios de penetração, permitindo que as hifas penetrem na cutícula e atingem a cavidade corporal do insecto (WESSELS, 1999).

O apressório serve para ancorar o esporo e exerce uma pressão para dentro do inseto. Em paralelo, o fungo excreta grande quantidade de enzimas entre os quais incluem proteases, quitinases, quitobiasas, lipases, lipoxigenases e outras enzimas hidrolíticas, que iram degradar a cutícula e, por sua vez, fornecem nutrientes para o fungo (ALVES, 1998a). Uma vez dentro do inseto, o fungo prolifera formando corpos de hifas secundárias com ramificação para a procutícula, composta principalmente de fibrilas de quitina lameladas incorporados em uma proteína de matriz que atua como uma cobertura de proteção nas secreções extracelulares do patógeno. Em seguida, os corpos de hifas encontram com a camada epidérmica e com a respectiva membrana basal, propagando-se pela hemocele. Assim, várias estruturas invadem o tecido muscular, corpos gordurosos, túbulos de Malpighi, mitocôndrias, hemócitos, retículo endoplasmático e a membrana nuclear (DIAZ et al., 2006).

Com o esgotamento dos nutrientes, o fungo começa a invadir, com crescimento micelial, todos os órgãos do hospedeiro. Finalmente, as hifas atravessam a cutícula do inseto

de dentro para fora e emergem na superfície, iniciando a formação de esporos quando a umidade relativa é adequada (GILLESPIE; CLAYDON, 1989; DIAZ et al., 2006).

Segundo Almeida e Batista Filho (2006), os sintomas de insetos doentes com fungos são: manchas escuras pelo corpo, paralisação da alimentação, paralisia geral, perda de coordenação de movimentos. Posteriormente o tegumento torna-se róseo, para depois assumir coloração esbranquiçada devido ao crescimento do micélio e a partir da esporulação o inseto assume a coloração da espécie do fungo. Por exemplo: branco para *Beauveria bassiana* e verde para *Metarhizium anisopliae*. Todas essas fases ocorrem entre 4 e 10 dias, dependendo do hospedeiro e da espécie do fungo (Figura 1.1).

Os fungos mais utilizados no mundo para controle de pragas são *M. anisopliae*, *B. bassiana*, e em menor escala encontram-se os fungos *L. muscarium*, *L. longisporum* e *I. fumosorosea*, sendo que todos pertencem ao grupo Hypocreales e cujo ciclo de vida mais explorado é o anamórfico ou assexuado. Esses fungos entomopatogênicos se encontram comercializados na forma de conídios em substratos sólidos (arroz), conídios puros e formulados de diferentes tipos de propágulos (micélio blastosporos e conídios) (FARIA; WRIGHT, 2007).

O primeiro trabalho para controle de praga com um fungo entomopatogênico ocorreu na Rússia em 1888, quando o fungo conhecido como *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin foi produzido massalmente em resíduos da fabricação de cerveja e aplicado no campo para controle do gorgulho-da-beterraba *Cleonus punctiventris* (Germar) (LORD, 2005).

Os estudos com fungos entomopatogênicos no Brasil começaram em 1923, quando foram identificadas duas espécies de cigarrinhas infectadas pelo fungo *M. anisopliae*. Esse fungo foi utilizado para combater a cigarrinha *Tomaspis liturata*, no primeiro trabalho de pulverização realizada no país. Na década de 40, os fungos entomopatogênicos voltaram a ser objetos de estudo em Sergipe, na busca pelo controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar: *Mahanarva fimbriolata*. Também foram relatados por Alves et al. (2008), outros programas de controle microbiano no Brasil com o fungo *B. bassiana*, para o controle de gafanhotos, cupim-de-montículo do gênero *Cornitermes* e a broca-do-cafeeiro *Hypothenemus hampei*.

Segundo Alves (1998c), o gênero *Paecilomyces* (= *Isaria*) reúne diversas espécies entomopatogênicas, tendo uma delas sido observada provocando epizootias sobre a população de lagartas de um dalcerídeo, praga de eucalipto no Espírito Santo. Também é muito comum a ocorrência do gênero causando epizootias em populações de lagartas dos coqueiros do gênero *Brassolis* no Sudeste do Brasil. *Paecilomyces* sp., já foi observado também sobre coleópteros, hemipteros e ortópteros.

Atualmente, existem instituições privadas e públicas realizando estudos e produzindo microrganismos para atuar no controle de pragas da agricultura. Um exemplo é o convênio entre a empresa Koppert Brasil e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP). Os estudos desenvolvidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ-USP) demonstraram que o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* (isolado ESALQ-1296) é altamente efetivo para o controle de *Diaphorina citri* em semi-campo e campo (CONCESCHI, 2013; AUSIQUE, 2014).

Figura 1.1 - Ciclo das relações patógeno-hospedeiro (ALVES, 1998a)

1.2 Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas

Os métodos para a seleção de microrganismos em laboratório como agentes de controle de insetos pragas envolvem certo número de fatores biológicos (por exemplo, maior porcentagem de eficácia em menor tempo). Entre as qualidades desejadas para seleção de fungo entomopatogênicos os pesquisadores Alves (1998a); Frigo e Azevedo (1986) destacam as seguintes: alta eficiência no controle, grande capacidade de disseminação, resistência às condições adversas, além de qualidades industriais como ótima produção de conídios e taxa de crescimento elevada e manter por longo tempo a sua viabilidade e infectividade, entre outras qualidades (GOETTEL; ROBERTS, 1992; FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994).

Entretanto para Alves (1998a), a quantidade de conídios é um fator de seleção importante em um isolado, pois quanto maior sua produção maior será o potencial de inóculo, em determinada quantidade de arroz, viabilizando o custo desse controle. Além do parâmetro

da produção de conídios, a germinação de conídios é um aspecto biótico relevante para alcançar a eficiência desejada dos fungos entomopatogênicos, que está diretamente relacionada a alto índice de germinação de conídios com alta virulência.

A alta variabilidade genética entre isolados de uma mesma espécie de fungos é amplamente relatada na literatura. Portanto, outro aspecto importante na seleção de isolados de fungos entomopatogênicos é o estudo da variabilidade genética entre isolados de uma mesma espécie. Esse procedimento tem sido empregado há muitos anos pelo Laboratório de Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP, sendo na maioria de casos, encontrados materiais promissores para o controle de diferentes espécies de insetos pragas, com resultados evidenciando a grande variabilidade genética existente entre os fungos entomopatogênicos; sendo assim, é importante e necessária a realização de uma seleção de isolados altamente virulentos para determinadas pragas (MOINO JÚNIOR, 1993; ALMEIDA; ALVES; PEREIRA, 1997; TAMAI, 1997; LOPES, 1999; TANZINI, 2002).

A eficiência dos fungos entomopatogênicos é influenciada por vários fatores bióticos e abióticos que interferem diretamente na sobrevivência e propagação dos fungos. Entre os fatores bióticos, Alves (1998a) relatou que, para haver uma epizootia, é necessário que a população da praga esteja elevada para favorecer a disseminação do parasita na planta; haja dispersão do inseto contaminado na área; o patógeno apresente alta virulência, alta capacidade de reprodução e capacidade de sobrevivência no ambiente. Entre dos fatores abióticos a temperatura, umidade relativa e radiação ultravioleta são os mais importantes e que afeta a viabilidade do conídio e ainda o crescimento do micélio, assim como a estabilidade de estocagem e sua patogenicidade em campo (LANZA; MONTEIRO; MALHEIROS, 2009).

Assim, Alves (1982) realizou a caracterização, padronização e produção de nove isolados do fungo *M. anisopliae* provenientes de diferentes regiões do Brasil, através das características morfológicas das colônias, produção, viabilidade e tamanho dos conídios e bioensaios com *G. mellonella* e *D. saccharalis*, elaborando um perfil de cada isolado, baseando-se no padrão electroforético e nas características biológicas estudadas. Estabeleceu que o isolado SPL-3F foi adotado como padrão para os testes de patogenicidade e agressividade, correspondendo a 1.000 unidades padrão de potência (UP) em *G. mellonella*, equivalentes a 54% de mortalidade em cigarrinha *D. flavopicta*.

Soza Gómez (1983) também realizou estudos de caracterização e padronização de 11 isolados de *M. anisopliae*, procurando selecionar os mais produtivos e patogênicos, visando a sua utilização no controle microbiano de insetos. A caracterização fundamenta-se em

produção, tamanho dos conídios, aspectos morfológicos, crescimento das colônias, produção em arroz e resistência à radiação ultravioleta. Os insetos utilizados nos bioensaios foram *D. saccharalis*, *G. mellonella* e *Tenebrio molitor*, concluindo que a linhagem SPL-52T apresentou menor suscetibilidade à radiação ultravioleta, maior produção de conídios em BDA e arroz e alta virulência para os três insetos testados.

Moino Júnior (1993) avaliou a patogenicidade de 72 isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para três espécies de insetos que atacam grãos armazenados no Brasil (Coleoptera: Curculionidae), observando uma grande variação nas mortalidades obtidas, encontrando isolados que foram totalmente ineficientes para essas pragas e outros isolados que causaram 100% de mortalidade.

Esta diferença de patogenicidade entre isolados também tem sido documentada para outros fungos entomopatogênicos como: *L. lecanii*, *I. fumosorosea* e (*Metarhizium*) *Nomuraea rileyi* (Farlow) quando a TL_{50} e a mortalidade total (JACKSON; HEALE; HALL, 1985; MANIANIA; FARGUES, 1992).

Na busca de novos agentes biológicos controladores de *D. citri*, Gandarilla-Pacheco et al. (2013) efetuaram bioensaios visando provar a patogenicidade dos fungos *B. bassiana*, *I. fumosorosea* e *M. brunneum* e relataram que o fungo *I. fumosorosea* resultou na maior mortalidade (84,2%) de controle para ninfas de *D. citri* em comparação dos demais fungos, possibilitando a utilização deste patógeno para incrementar o controle biológico desta importante praga.

1.3 Produção de conídios de fungos entomopatogênicos

As estruturas mais produzidas e comercializadas dos fungos entomopatogênicos: *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea* são os conídios, utilizando-se meio de cultura sólido (ALVES, 1998a). Esse processo tem sido usado para a manutenção rotineira de isolados e produção em pequena escala de conídios visando estudos de laboratório, bem como a produção em grande escala visando testes de campo e comercialização. O fungo é produzido na superfície de meio sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006).

A produção dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* tem sido feita no Brasil por empresas privadas e públicas. Estes fungos apresentam uma grande variabilidade natural e as empresas produtoras não tem explorado em este potencial. Normalmente, o isolamento do fungo é feito a partir de um inseto infectado naturalmente sob condições de campo (ALVES, 1982).

As técnicas de produção de fungos para controle de pragas devem ter baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração e formas viáveis e virulentas do patógeno, que possam ser formuladas e utilizadas (ALVES, 1982).

No entanto, a maioria dos fungos, não é produzida em quantidades adequadas para ser utilizados no controle de pragas. Para serem utilizados com eficiência no controle microbiano de insetos, na estratégia chamada introdução inundativa, esses patógenos necessitam estar disponíveis em grandes quantidades. Isso se deve ao fato que os insetos normalmente necessitam de elevada quantidade de inóculo para serem colonizados por esses patógenos (ALVES, 1998b).

A produção em escala industrial de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica. A pesquisa de novas metodologias de sistemas de produção é muito importante para tornar o controle microbiano economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas (TANZINI, 2002).

A seleção de um meio de cultivo e o conhecimento das condições de cultivo mais adequadas para uma espécie ou linhagem são dois dos fatores mais importantes na produção massal de fungos entomopatogênicos para garantir bom crescimento com alta esporulação (VERHAAR; HIJWEGEN, 1993; KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985).

Um meio de cultura deve possuir, basicamente, uma fonte de carbono (C) e nitrogênio (N), sais minerais e alguns fatores de crescimento (SOPER; WARD, 1981). As fontes de C geralmente utilizadas são: amido, glicose, sacarose, dextrose e diversos outros açúcares, enquanto que as fontes de N são geralmente componentes ricos em proteína e/ ou aminoácidos, como extrato de soja e outros subprodutos vegetais, extrato de levedura e peptona, podendo utilizar também componentes inorgânicos como o ácido casamino (LEITE et al., 2003).

Vários trabalhos têm sido efetuados com o objetivo de se encontrar meios de cultura que favoreçam a esporulação, bem como reduzir o custo final do inseticida (VILAS BOAS; ANDRADE; OLIVEIRA, 1996). O arroz e trigo são os substratos mais utilizados. O fungo é produzido na superfície de meio sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala comercial (LEITE et al., 2003).

A superioridade do meio de arroz, em relação ao de amido e batata-dextrose no desenvolvimento e esporulação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* já foi comprovada por Aquino (1974).

O arroz é inicialmente mergulhado em água previamente aquecida por 15 minutos, dentro de uma vasilha, até obter a consistência emborrachada. Em seguida, o arroz pré-cozido

é colocado dentro de frascos de vidro, sacos de polipropileno ou bandejas autoclaváveis e autoclavado por 30 minutos. Com o objetivo de fornecer espaço e oxigênio para o fungo crescer, o substrato deve ocupar no máximo a metade do volume do recipiente (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006).

Após o resfriamento, o meio é inoculado com conídios e, em seguida, incubado a 25°C. O uso de sacos plásticos autoclaváveis é o método mais utilizado para a produção de *M. anisopliae*. Após 10 a 15 dias de incubação, os sacos são abertos e seu conteúdo exposto ao ar ou fluxo de ar levemente aquecido por 24 horas, até secar à umidade de 15% aproximadamente. O material então é embalado e armazenado sob-refrigeração a 5°C por até três meses e até seis meses a -10°C.

Os pesquisadores Clerk e Madelin (1965) avaliaram a influência da temperatura, umidade, concentração de gás carbônico e luminosidade sobre a estabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa*, e concluíram que a viabilidade dos conídios foi reduzida pela exposição à luz e elevação de temperatura. Os conídios de *B. bassiana* e *I. farinosa* perderam a capacidade de germinação mais rapidamente nas umidades mais elevadas, enquanto que *M. anisopliae* sobreviveu durante mais tempo nas umidades extremas. Os citados autores verificaram que quando os conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa* foram mantidos no escuro a 8°C e 0% de umidade relativa, observou-se uma germinação próxima a 90% dos referidos fungos, após 28, 635 e 140 dias, respectivamente. *M. anisopliae* apresentou 92% de conídios germinados após 252 dias quando mantidos no escuro a 8°C e 75% de umidade relativa. A retirada de oxigênio eliminou o efeito desfavorável de umidades relativas intermediárias para a viabilidade de conídios de *M. anisopliae*.

1.4 Tolerância de fungos entomopatogênicos a condições climáticas adversas (radiação UV-B e temperatura elevada)

Os fungos entomopatogênicos ao serem aplicados sob condições de campo estão sujeitos à ação de fatores bióticos e abióticos, que podem influenciar na sua sobrevivência, propagação e infecção no hospedeiro (GOETTEL INGLIS; WRIGHT, 2000). Entre os abióticos, destaque-se a temperatura, umidade e a radiação ultravioleta que podem afetar a sobrevivência dos fungos (ABREU et al., 1983; BATISTA FILHO; CARDELLI, 1986; BRAGA et al., 2001b).

A radiação solar UV é a mais importante, pois pode provocar aquecimento e dessecação dos conídios além de danos letais ao DNA, proteínas, biomembranas, RNA, ribossomos e mutações, consequentemente podendo causar atraso na germinação, inativação de conídios e redução da atividade inseticida (RANGEL et al., 2006; CHELICO; KHACHATOURIANS, 2008; FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001a). Comprimentos de ondas entre 230 e 380 nm estimula a esporulação em alguns fungos (LEACH, 1965), para outros fungos o comprimento de onda da luz UV-B (280-320 nm) é a parte mais prejudicial da luz artificial, seguido pela luz UV-A (320-400 nm). Radiações visíveis e infravermelhas próximas foram menos prejudiciais do que UV-B (FARGUES et al., 1997). Em fungos entomopatogênicos, os estudos sobre efeitos da luz ultravioleta concentram-se em duas áreas: estímulo à esporulação e efeitos letais da luz UV-B (VALLE, 1984; LEACH, 1965; BRAGA et al., 2001a).

Para se medirem os efeitos dos raios UV-B sobre os fungos entomopatogênicos, pode-se utilizar lâmpada própria para radiação, com simulador de radiação solar (FARGUES et al., 1996) ou com radiação natural (ROTEM; WOODING; AYLOR, 1985; SMITS et al., 1996).

O simulador solar permite que se exponham vários isolados em diferentes tempos de exposição, e permite ainda que se tenha uma exposição estável em todos os experimentos. As lâmpadas utilizadas no simulador solar reproduzem o espectro e intensidade próximos aos da luz solar (ROBERTS; FLINT, 2002).

Certas lâmpadas fluorescentes emitem raios UV-A, UV-B e estas podem ser usadas separadamente, em combinação ou ainda combinadas a outras lâmpadas que produzem alta intensidade de UV-A, UV-B e luz visível. O espectro dessas lâmpadas reproduz uma radiação semelhante à da luz solar ao meio-dia e, atualmente, são usadas em várias pesquisas com microorganismos (FARGUES et al., 1997).

O método menos utilizado é o da radiação natural, dada a sua alta variação ao longo do tempo, o que dificulta as pesquisas com microorganismos a respeito da tolerância ao UV e seus efeitos (ROBERTS; FLINT, 2002).

Alguns autores sugerem selecionar isolados mais tolerantes à radiação UV-B, pois sabe-se que a suscetibilidade dos fungos à radiação varia entre diferentes espécies e entre linhagem (FARGUES et al., 1996). Diversos trabalhos têm sido realizados, em particular na França, Estados Unidos, Canadá, Eslováquia, Grécia e Brasil (FARGUES et al., 1996; INGLIS; JOHNSON; GOETTEL, 1997; FOURTOUNI; MANETAS; CHRISTIAS, 1998; CAGAN; SVERCEL, 2001; BRAGA et al., 2001a; BRAGA et al., 2002), com objetivo de

encontrar isolados tolerantes à radiação UV-B, ou seja, que mantenham a viabilidade e a virulência (CAGAN; SVERCEL 2001; BRAGA et al., 2001c).

Um dos primeiros trabalhos sobre a inativação de fungos entomopatogênicos pela radiação ultravioleta foi feito por Ignoffo et al. (1977), que testou a estabilidade de vários tipos de patógenos. Os mesmos autores determinaram que, *Metarhizium rileyi* foi mais estável que entomopoxvirus, NPV, CPV e *V. necatrix*, semelhante a *Bacillus thuringiensis*.

Pesquisas com objetivo de avaliar os efeitos da radiação UV-B sobre a germinação e a formação de colônias dos fungos *M. anisopliae* e *M. flavoviridae* sob condições de laboratório e diferentes meios de cultura, revelaram isolados tolerantes à luz ultravioleta, com porcentagem de germinação em torno de 60%, após 2 horas de exposição (HUNT et al., 1994; BRAGA et al., 2001b).

Zimmermann (1982) estudou em condições de laboratório o efeito da luz solar na viabilidade de conídios de *M. anisopliae*, expondo o fungo a uma luz solar artificial. Determinou-se que foi necessário 1 hora e 40 minutos de irradiação para inviabilizar 50% dos conídios, incubando-os após a irradiação a 25°C e no escuro, por um período de 24 horas. Quando se utilizou um período de 48 horas de incubação nas mesmas condições anteriores, o tempo de irradiação para inviabilizar 50% dos conídios foi de 2 horas e 45 minutos. Alves (1986) determinou a DL₅₀ da luz ultravioleta germicida (253,7 nm) para vários isolados de *M. anisopliae*, sendo que esta variou de 32,0 a 68,2 segundos.

Para as espécies *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, os efeitos deletérios da exposição ao UV-B são claramente demonstrados, ocorrendo à redução na viabilidade e virulência (INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1995; FARGUES et al., 1996); resultados semelhantes demonstram que 2 e 3 horas de exposição ao UV-B são suficientes para redução drástica da virulência de conídios de *M. anisopliae* a lagartas de 3º ínstar de *D. saccharalis* (FRANCISCO, 2004).

Franco (2005) avaliou a tolerância de conídios de fungos entomopatogênicos às radiações UV-A e UV-B em função do tempo de cultivo e concluiu que a tolerância varia em função do tempo de cultivo e a espécie de fungo. A tolerância dos conídios dos fungos *I. fumosorosea* e *M. anisopliae* é incrementada à medida que se aumenta o tempo de cultivo. O inverso ocorre com o isolado *Aschersonia aleyrodalis*. Para *B. bassiana*, conídios jovens ou muito velhos são os menos tolerantes ao UV-B.

Fargues et al. (1996) demonstraram que conídios de *I. fumosorosea* são altamente suscetíveis à radiação solar e ainda mais suscetíveis em comparação com os conídios de *M. flavoviride*, *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Exposição por 2 h para uma ampla faixa de onda

295-1100 nm a 25°C e 40% RH resultou em um decréscimo acentuado na sobrevivência de todos os isolados de *I. fumosorosea* testados, e após 4 h de irradiação, apenas 21% dos isolados exibiram >0,1% de sobrevivência. Além disso, a interação entre a temperatura e radiação solar também tem o efeito prejudicial na persistência de conídios de *I. fumosorosea* (SMITS et al., 1996).

Tinline e Noviello (1971) utilizaram a radiação ultravioleta visando à produção de mutantes do fungo *M. anisopliae*. Posteriormente, Santos (1978) estudou a influência de diversos fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *M. anisopliae* e observou que as radiações gama e ultravioleta podem ser utilizadas como agentes mutagênicos, empregando-se 32 krad de radiação gama e um tempo de exposição igual a 2 minutos e 40 segundos de radiação ultravioleta, sendo que a sobrevivência dos conídios para as doses empregadas variou de 1 a 5%.

A maioria dos fungos mitosporicos é favorecida por temperaturas próximas de 25°C durante seu crescimento e conidiogênese, enquanto que os Entomophthorales preferem temperaturas mais amenas, em torno de 20°C. *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *M. rileyi* e *I. fumosorosea* apresentam faixas de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de 24 a 30°C, 22 a 26°C, 20 a 30°C e 22°C a 30°C, respectivamente (ALVES, 1986; ZIMMERMAN, 2008).

A temperatura é um dos fatores de grande importância e atua sobre os patógenos afetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo. Esse fator torna-se ainda mais importante tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura (ALVES, 1982).

Zimmermann (2008) observou que geralmente, o fungo *I. fumosorosea* prefere temperaturas mais elevadas em comparação com *I. farinosa*, mas há fortes diferenças no intervalo de temperatura entre as duas espécies de fungos, ademais indica que exista uma alta variabilidade genética entre as duas espécies. Vários isolados de *I. fumosorosea* da França cresceram entre 11 e 30°C (FARGUES et al., 1992). Entretanto Mietkiewski et al. (1994) relataram que o crescimento do fungo *I. fumosorosea* era de 5 e 32°C, e o ótimo de 25°C.

Os principais fatores ambientais que afetam a eficiência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* como agentes de controle biológico de *Hylobius pales* foram estudados por Walstad, Anderson e Stambaugh (1970). Esses autores verificaram que *B. bassiana* teve a viabilidade reduzida após 15 dias quando submetido à temperatura de 21°C, em comparação com o fungo *M. anisopliae* que teve a viabilidade reduzida após 75 dias, sob a mesma temperatura. Ambos permaneceram viáveis após 12 meses, quando foram armazenados a 8°C.

Villacorta (1977), trabalhando com diferentes isolados de *M. anisopliae* verificou que a 37°C houve inibição da germinação de conídios, tornando-os inviáveis quando os mesmos eram submetidos por mais de 96 horas a essa temperatura. Esse efeito foi também observado por Abreu et al. (1983) demonstrando que temperaturas de 25 a 28°C resultaram em perdas na viabilidade de conídios de *M. anisopliae* aos 120 dias de armazenamento e redução da patogenicidade para a traça *Galleria mellonella*.

Vidal, Fragues e Lacey (1997) revelaram uma forte variação no efeito da temperatura sobre o crescimento de 37 isolados de *I. fumosorosea* de diferentes origens, observando taxas de crescimento ótimas entre o intervalo de 20-30°C. Yeo et al. (2003) relataram que o crescimento de vários isolados de *I. fumosorosea* foram observadas entre o intervalo de 10 e 25°C, muitas vezes o crescimento foi mais rápido na temperatura de 10°C em comparação com outras espécies de fungos.

Zimmermann (1982) verificou correlação entre as condições de umidade presentes e a resistência dos conídios de *M. anisopliae* ao calor. Para a exposição de suspensão aquosa por 30 minutos, a temperatura média letal foi de 42°C. Conídios em pó submetidos às umidades de 100, 76 e 33% tiveram temperaturas médias letais de 50,5; 57 e 68,8°C, respectivamente. Foi constatado ainda que após 30 minutos de aquecimento da suspensão a 45°C, apenas 6,2% dos conídios germinaram com 24 horas de incubação. Decorridas 48 horas, a germinação totalizou 81,8%.

Doberski (1981) realizou testes para determinar o efeito da umidade e temperatura nos fungos entomopatogênicos: *I. farinosa* e *B. bassiana* encontrando-se efetividade a 2°C ao contrário do *M. anisopliae* que não foi eficaz abaixo de 10°C, concluindo que os fungos apresentam bom desenvolvimento em intervalo de temperaturas de 15 a 20°C, sendo o ótimo de 25°C. Encontrou semelhança com os resultados de Hallsworth e Magan (1999), que afirmam que a temperatura variou de acordo com o crescimento ideal dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. farinosa* a 25, 30 e 20°C, respectivamente.

Doberski (1981) avaliou umidades relativas entre 51 e 100%, encontrou que o fungo *I. farinosa* não tem efeito em umidades baixas ao contrário de outros fungos testados. Os intervalos de maior mortalidade para todos os fungos foram observados com umidades relativas elevadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Kawakami e Mikuni (1965), ao trabalhar com conídios dos fungos *I. fumosorosea* e *I. farinosa* no Japão, verificarem a redução da longevidade dos conídios em função do aumento da temperatura e do aumento da viabilidade sob condições de baixa umidade relativa. Os citados autores verificaram que a viabilidade dos conídios sob condições de umidade relativa elevada,

próximas a 80%. Após armazenamento por 50 dias as viabilidades em meio de cultura foram: 36,7% e 59,9% respectivamente, e após 115 dias, os fungos tornaram-se inviáveis.

Fargues e Bom (2004) trabalhando com 2 isolados de *I. fumosorosea*, encontraram preferência da temperatura dos isolados para infectar seu inseto hospedeiro padrão, a traça *G. mellonella*.

1.5 Formulações com fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são agentes promissores para o controle biológico de pragas. Então várias espécies de fungos, incluindo: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, Sorokin, e *I. fumosorosea* foram registradas em todo o mundo, e sendo usados atualmente 8 diferentes micoacaricidas e micoinseticidas (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Esses produtos, com base em conídios de fungos, constituem apenas uma pequena percentagem do total de inseticida no mercado, devido à sua alta variação na eficácia de controle de pragas e sua curta vida útil (YATIN et al., 2006; BURGESS, 1998). Na última década, os esforços têm sido feitos para melhorar a sua vida útil; para o maior sucesso de tempo de prateleira os biopesticidas requerem 12-18 meses de vida útil, mas a maioria dos produtos têm apenas 6-12 meses de armazenamento a temperatura ambiente (DEVI et al., 2005; KIM; JE; ROH, 2010).

Um dos fatores limitantes à utilização em maior quantidade de fungos entomopatogênicos é a dificuldade na manutenção da viabilidade dos conídios por longos períodos (McCLATCHIE et al., 1994), o que torna importante a necessidade de desenvolvimento de formulações e embalagem que aumentem a vida de prateleiras dos conídios.

Os principais fatores que influenciam de forma direta a viabilidade dos conídios durante o armazenamento são a umidade, a temperatura e a luminosidade, esses fatores podem ser gerenciados para aumentar a viabilidade dos conídios. A umidade e a temperatura baixas são geralmente fatores de estabilidade do produto mantendo-o viável por maior tempo. Entretanto, a baixa temperatura requer custos de armazenamento e a baixa umidade tem custo de secagem. A luminosidade requer embalagem especial que não possibilite que a luz atinja os conídios durante o armazenamento (ALVES, 1998a).

Secagem de conídios é outra abordagem durante o processo de aumentar o tempo de prateleira que permite que os conídios não perda a viabilidade (HONG; JENKINS; ELLIS, 2005; HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004; MOORE et al., 1996). Um passo importante no

desenvolvimento de bioinseticidas com fungos entomopatogênicos é a otimização da manipulação dos conídios pós-colheita. Tanto a pré-secagem de conídios e mantê-los secos, são críticos para o armazenamento de longo prazo na sala com temperatura (25-32°C). Entretanto Moore et al. (1996) relataram que conídios armazenados após de 98 dias em temperatura ambiente, apresentaram 76% de viabilidade de conídios pré-secados com sílica gel em comparação com conídios secos sem sílica gel. Para Hong, Jenkins e Ellis (2000); Magalhães e Boueias (2004), A dessecação lenta melhorou a sobrevivência de *M. flavoviride* e *M. anisopliae*, o que implica que a taxa de secagem influenciou a viabilidade de conídios.

Outro fator importante que influencia severamente a germinação dos conídios que foram previamente desidratados por conta da estocagem ou formulação é o processo de embebição conidial. Essa absorção rápida de água (embebição) pode causar graves danos na membrana plástica do fungo, afetando sua viabilidade. O possível dano de embebição pode ser revertido pela utilização de água norma ou pela realização uma reidratação lenta desses conídios antes de serem imersos em água (FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009). Esse efeito foi também relatado por Moore, Langewald e Obognon (1997), ao verificarem que conídios secos de *M. anisopliae* são propensas a danos, mediante exposição direta à água.

Novas pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para o controle biológico de pragas têm aumentado significativamente nos últimos anos, e um número considerável de biopesticidas à base de fungos entomopatogênicos. Historicamente o desenvolvimento de dois micopesticidas impulsionou o avanço tecnológico nas áreas de produção e formulação de fungos entomopatogênicos em escala industrial no ocidente. Boverin, um micoinseticida à base de *B. bassiana* (Bals.) Vuill., para controle de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) na antiga União Soviética, foi desenvolvido em 1965 (KENDRICK, 2000). Também Mycar, um micoacaricida baseado em *Hirsutella thompsonii* Fisher, teve registro concedido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos em 1981, para controle do ácaro-da-falsa-ferrugem dos citros, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Eriophyidae) (McCOY, 1986).

Micopesticidas são produtos à base de propágulos vivos de fungos visando o controle de pragas através de aplicações inundativas e inoculativas (FARIA; WRAIGHT, 2007). Os tipos de propágulos presentes em muitos tipos de produtos à base de fungos entomopatogênicos são classificados como hifas (micélio), blastosporos ou conídios; estes últimos podendo ser aéreos ou submersos (WRAIGHT; JACKSON; KOCK, 2001; LEITE et al., 2003).

Formulação refere-se à mistura do ingrediente ativo (propágulo vivo do fungo), um diluente, dispersor, agente molhante, aderente, protetores contra radiação ultravioleta e fatores promotores de virulência ou sinergistas (LATGÉ; MOLETTA, 1988; MOORE; CAUDWELL, 1997; JONES; BURGESS, 1998). Knowles (2008) e Bateman, Mathews e Hall (2007) relataram que para o preparado de uma formulação devem ser considerados alguns fatores, dentre eles podem-se destacar: as características físico-químicas, atividade biológica e modo de ação, método de aplicação, segurança, custos da formulação e preferências de mercado. Após a determinação desses parâmetros, é realizada a seleção do tipo de formulação a ser utilizada.

Os principais objetivos do preparo de uma formulação no caso de produtos biológicos visam: a) estabilizar o agente biológico durante a produção, distribuição e armazenamento; b) facilitar o manuseio e aplicação do produto; c) proteger o agente biológico contra fatores ambientais adversos (UV, baixa umidade, temperaturas elevadas) aumentando sua persistência no ambiente; d) aumentar a atividade do agente biológico, contato e interação com a praga-alvo e, e) aumentar a segurança do produto ao usuário, reduzindo os riscos de inalação, irritação aos olhos etc. (JONES; BURGESS, 1998).

Pelo menos 12 espécies ou subespécies (linhagens) de fungos têm sido empregadas como ingredientes ativos em micoinseticidas e micoacaricidas visando o controle inundativo e inoculativo de pragas. A maioria dos fungos utilizados nos micopesticidas são anamórficos. Micopesticidas baseados em *B. bassiana* (33,9%), *M. anisopliae* (33,9%), *Lecanicillium* spp. (9,4%), *I. fumosorosea* (5,8%) e *B. brongniartii* (4,1%) são os mais comuns entre os produtos já desenvolvidos em escala mundial (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Nas últimas quatro décadas mais de 80 companhias no mundo desenvolveram 171 micoinseticidas e micoacaricidas (FARIA; WRAIGHT, 2007). Embora muitos produtos estejam baseados em tipos específicos de propágulos, o produto final pode conter pequena ou substancial quantidade de outros tipos de propágulos. Produtos baseados em conídios aéreos podem conter hifas e vice-versa e micoinseticidas produzidos através de fermentação líquida podem apresentar uma mistura de conídios submersos, blastosporos e hifas. A exata composição de propágulos dos produtos biopesticidas é raramente indicada pelos fabricantes e, em alguns casos, o propágulo específico constituindo o ingrediente ativo não é indicado (LEITE et al., 2003).

Pesquisas feitas por Faria e Wraight (2007), identificaram um total de 11 categorias de produtos técnicos e formulações, com concentrados técnicos (substratos colonizados por fungos) (26,3%), pós molháveis (20,5%) e dispersões oleosas (15,2%) entre as mais comuns.

Dos 129 produtos atualmente disponíveis no mundo (em processo de registro, registrados ou comercializados com ou sem registro), mais de 90% foram desenvolvidos para controle biológico inundativo, enquanto menos de 10% foram destinados exclusivamente para estratégias de controle inoculativo, a exemplo daqueles produtos formulados somente com hifas ou substratos colonizados com fungos para controle de besouros habitantes do solo. Aproximadamente 43% de todos os produtos foram desenvolvidos ou disponibilizados comercialmente por empresas ou instituições da América do Sul, sobretudo no Brasil e Colômbia.

Produtos desenvolvidos ou disponibilizados comercialmente por empresas e instituições da América do Sul representam 42,7% do total listado em escala mundial, seguidos pela América do Norte (20,5%), Europa e Ásia (12,3% cada), América Central (7,0%), África (2,9%) e Oceania (2,3%) (MICHEREFF FILHO; FARIA; WRIGHT, 2007).

No Brasil, o fungo *M. anisopliae* é usado em grande escala para controlar um complexo de cigarrinhas, incluindo *Mahanarva fimbriolata* (Stål) e *M. posticata* em cultivos de cana-de-açúcar, e *M. fimbriolata*, *Deois flavopicta* (Stål) e *Notozulia entreriana* (Berg) em pastagens. Na realidade, várias pesquisas e programas de controle microbiano com fungos entomopatogênicos foram implementados no Brasil nas últimas quatro décadas (ALVES, 1998a; FARIA; MAGALHÃES, 2001). Portanto, a disponibilização de micopesticidas padronizados, com elevada concentração e viabilidade de estruturas infectivas, fáceis de utilizar, com preço competitivo e com eficiência de controle previsível, são fundamentais para a reversão do cenário atual dos fungos entomopatogênicos no Brasil (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

O desenvolvimento de uma formulação adequada é essencial para a utilização com sucesso de micopesticidas comerciais (DAOUST; WARD; ROBERTS, 1983). Por exemplo, muitas formulações podem afetar a viabilidade de conídios, resultando em uma curta vida útil (MOORE; PRIOR, 1993). Há necessidade de uma avaliação cuidadosa da compatibilidade dos componentes da formulação com conídios antes da sua utilização em formulações (DAOUST; WARD; ROBERTS, 1983). Por isso, um dos primeiros passos no desenvolvimento de uma formulação de micopesticidas é avaliar os efeitos dos seus componentes na viabilidade de conídios para selecionar produtos compatíveis com conídios do fungo.

Os trabalhos de compatibilidade entre produtos fitossanitários e fungos entomopatogênicos são ferramentas indispensáveis ao manejo integrado de pragas, contribuindo para a preservação destes patógenos e, conseqüentemente, mantendo o equilíbrio

ambiental dentro do sistema agrícola (NORRIS; CASWELL-CHEN; KOGAN, 2003), sendo a germinação considerada como o principal fator a ser avaliado nestes testes de viabilidade (ANDERSON; ROBERTS, 1983; HIROSE et al., 2001; NEVES et al., 2001; SILVA; NEVES, 2005).

Os óleos emulsionáveis são uma alternativa de utilização como adjuvante na calda de pulverização, pois é possível misturar com água, e permitir a aplicação dos fungos entomopatogênicos com equipamentos convencionais já utilizados pelos produtores rurais, além da possibilidade em aumentar a infectividade do fungo (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998). Também têm a vantagem de promover excelente adesão na cutícula hidrofóbica do inseto (PRIOR; JOLLANDS; PATOUREL, 1988; COSTA; COSTA; SLAMA, 2003). Alguns trabalhos têm demonstrado a viabilidade de uso de fungos entomopatogênicos em conjunto com óleos e adjuvantes em formulações (NANKINGA; MOORE, 2000; CONSOLO; SALERNO; BERON, 2003; LUZ et al., 2004).

Muitos esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento e industrialização de formulações à base de óleo usando *B. bassiana* e *M. anisopliae* como acima, enquanto que há menos informação disponível sobre a persistência de conídios de *I. fumosorosea* em base de formulações com óleo (COPPING, 2004).

Os produtos fitossanitários que possuem óleos nas suas formulações, tanto de origem vegetal como mineral, utilizados como inseticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas e espalhantes adesivos são testados para melhorar seus efeitos misturados com fungos entomopatogênicos. Entretanto, alguns desses produtos podem influenciar nos microrganismos, como no caso dos fungos entomopatogênicos, nos quais o crescimento vegetativo, a esporulação e a viabilidade, ou até mesmo a composição genética podem ser modificadas, alterando a sua virulência (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998).

Pesquisas têm demonstrado que a formulação de fungos entomopatogênicos em óleo natural aumenta a sua infectividade em comparação com formulações convencionais à base de água (AGUDELO; FALCON, 1983; PRIOR; JOLLANDS; PATOUREL, 1988; BATEMAN; MATHEWS; HALL, 1993).

1.6 Características gerais de *I. fumosorosea*

O gênero *Isaria* é um grupo de muitas espécies que podem infectar diferentes ordens de insetos em todas as fases do desenvolvimento do inseto e pode ser frequentemente isolada do solo (SAMSON, 1974; TIGANO-MILANI et al., 1993). Os conídios são geralmente de cor

hialina, unicelular e produzidos em cadeias basípeta. Uma recente mudança na nomenclatura do gênero *Paecilomyces* foi proposta pelo autor Luangsa-Ard et al. (2005), baseados em estudos moleculares, que analisaram as relações filogenéticas de 37 espécies de *Paecilomyces* seção Isarioidea. No estudo, os autores reconheceram um grupo monofilético de espécies que foi então designado como a clade *Isaria*, na qual se encontram as espécies *I. farinosa* e *I. fumosorosea*, entre outros. As espécies *Paecilomyces* remanescentes formalmente localizadas na seção Isarioidea (incluindo *P. lilacinus*), precisam ser mais bem estudadas e, portanto, permanecem no gênero *Paecilomyces*. Entretanto Hodge et al. (2005) discutiram a nomenclatura e a história do gênero *Isaria*, e Gams et al. (2005) propuseram conservar o nome *Isaria*.

As espécies mencionadas: *P. amoeneroseus*, *P. cateniannulatus*, *P. cateniobliquus*, *P. cicadae*, *P. coleopterorus*, *P. farinosus*, *P. ghanensis*, *P. fumosoroseus*, *P. javanicus* e *P. tenuipes*, analisadas por Luangsa-Ard et al. (2005), foram reclassificadas como *Isaria* e suas nomenclaturas foram modificadas como: *I. amoenerosea*, *I. cateniannulata*, *I. cateniobliqua*, *I. cicadae*, *I. coleopterora*, *I. farinosa*, *I. ghanensis*, *I. fumosorosea*, *I. javanica* e *I. tenuipes*, respectivamente.

O fungo *I. fumosorosea*, foi descrito como *Paecilomyces fumosoroseus* por M. Wize em 1904. Foi descoberto num gorgulho da beterraba na Ucrânia, mas tem uma grande distribuição pelo mundo. *I. fumosorosea* é uma espécie complexa, o que significa que existe grande variabilidade entre os isolados da mesma espécie. O fungo é encontrado no solo, nas plantas, no ar, em todos os continentes do mundo, exceto Antártica (CANTONE; VANDENBERG, 1998; ZIMMERMANN, 2008).

O fungo *I. fumosorosea* foi isolado a partir de mais de 40 espécies de artrópodes, representando 10 ordens. Alguns dos organismos susceptíveis mais comumente conhecidos incluem gorgulhos, besourosdo-solo, besouros, pulgões de plantas, moscas brancas, psilídios, vespas, cupins, tripes, e uma grande variedade de borboletas e mariposas (SMITH, 1993; DUNLAP; JACKSON; WRIGHT, 2007; HOY; RAGHUWINDER; ROGERS, 2010).

I. fumosorosea cresce rapidamente e coloniza com micélio branco, que pode mudar para cor rosa ou púrpura. As fiálides são em forma de balão e os conídios são de cilíndricos a fusiforme (ZIMMERMAN, 2008). Não foi observado um ciclo sexual, mas recombinação mitótica por meio do ciclo parassexual foi avaliado sob condições de laboratório (CANTONE; VANDENBERG, 1998). Esse fungo é muitas vezes hiperparasitado por *Syspastospora parasitica*, outro ascomiceto (POSADA et al., 2004).

Recentemente, numerosos estudos moleculares demonstraram uma alta variabilidade dentro da espécie. Entretanto Gauthier et al. (2007) revelaram a existencia pelo menos duas grandes linhagens dentro do fungo *I. fumosorosea*, uma das quais está intimamente associada com a mosca-branca *Bemisia tabaci*, e encontrada principalmente nas Américas, e outra distribuída por toda a Ásia em vários grupos. Estudos semelhantes feitos por Fargues et al. (2002) reconheceram três grupos monofiléticos diferentes com base nos dados de sequência genética. Uma alta variabilidade dentro da espécie *I. fumosorosea* foi observada o que sugere tratar-se de complexo de espécies em vez de uma única espécie, e provavelmente em futuros trabalhos existirão revisões taxonômicas deste grupo (ZIMMERMANN, 2008).

Vários fatores, bióticos e abióticos, influenciam o crescimento, a estabilidade e patogenicidade de *I. fumosorosea*. Entre os fatores abióticos de maior importância destacam a temperatura, umidade relativa, radiação ultravioleta e planta hospedeira do inseto-alvo (ZIMMERMAN 2008).

Pesquisas feitas por Zimmerman (2008) relataram que plantas hospedeiras de inseto podem também afetar a viabilidade de *I. fumosorosea*, já que estas plantas produzem compostos chamados aleloquímicos, que podem inibir o crescimento e esporulação do fungo. Algumas substâncias mais notáveis como: ácidos tânico, solanina, camptotecina, xantotoxina, e tomatina podem reduzir a germinação de conídios e blastosporos. As últimas três substâncias mencionadas acima também podem inibir o crescimento micelial do fungo. Uma vez que o fungo não se encontra no interior da planta, essas substâncias aleloquímicos não desempenham um papel importante na viabilidade e crescimento do fungo, mas pode ser prejudicial se estiver presente na superfície ou se forem sequestrados no tecido do hospedeiro artrópode (LACEY; MERCADIER, 1998).

1.7 Controle de pragas com *I. fumosorosea*

O controle microbiano é considerado uma importante ferramenta para o manejo integrado de pragas (MIP). Os fungos entomopatogênicos são empregados como agentes de controle biológico reduzindo populações de pragas e consequentemente, não causa dano ao agro ecossistemas (INGLIS; GOETTEL; STRASSER, 2001).

Leatherdale (1970) listou três lepidópteros e um coleóptero como hospedeiros do fungo *I. fumosorosea*. Posteriormente, Smith (1993) e Zimmermann (2008), apresentaram uma lista de insetos hospedeiros para *I. fumosorosea*, que compreende mais de 40 espécies de insetos y acaros das ordens: Acari, Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera,

Isoptera, Lepidoptera, Neuroptera e Thysanoptera. Muitos trabalhos feitos com este fungo têm como alvo o controle da mosca branca *Bemisia tabaci* (SMITH, 1993; DUNLAP; JACKSON; WRIGHT, 2007; HOY; RAGHUWINDER; ROGERS, 2010).

Cepas de *I. fumosorosea* são altamente eficientes para o controle da mosca branca *B. tabaci* sendo utilizados como pesticida biológico na Europa, México e Colômbia (FARIA; WRIGHT, 2007). Além disso, uma cepa de *I. fumosorosea* foi encontrado naturalmente infectando adultos de *D. citri* na Flórida (MEYER; HOY; BOUCIAS, 2008). Resultados recentes obtidos por Padulla e Alves (2009); Conceschi (2013) e Ausique (2014) revelaram que isolados de *I. fumosorosea* foram patogênicos a ninfas e adultos de *D. citri* em condições de semi-campo e campo no Brasil.

Estudos mostram que o fungo normalmente não infecta os agentes de controle biológico natural de *D. citri* e em consequência seria adequado em programas de MIP nos pomares de citros (AVERY et al., 2008, 2009; SUBANDIYAH et al., 2000; MEYER; HOY; BOUCIAS, 2008; HOY; RAGHUWINDER; ROGERS, 2010). Em todo o mundo, foram desenvolvidos oito diferentes micopesticidas a base de *I. fumosorosea* (FARIA; WRIGHT, 2007). Todos são considerados seguros e não são tóxicas para os seres humanos e aves (DALLEAU-CLOUET et al., 2005; ZIMMERMAN, 2008).

Há poucas informações sobre especificidade do fungo *I. fumosorosea*, mas os pesquisadores Vandenberg e Cantone (2004) observaram variação na especificidade e outros parâmetros para três isolados *I. fumosorosea* contra o pulgão *Diuraphis noxia* e a traça-das-crusíferas, *Plutella xylostella*. Panyasiri, Attathom e Poehling (2007) descobriram que todos os cinco isolados de *I. fumosorosea* testados, foram altamente virulentos contra o tripses *Ceratothripoides claratris* alcançando mortalidade de 80-93%, sendo moderadamente eficiente para *B. tabaci* com mortalidade de 37-77% e menos eficiente contra a cochonilha *Pseudococcus cryptus* com mortalidade de 10-43%. Estudos filogenéticos indicam que os isolados testados e identificados como *I. fumosorosea* compreendem na realidade um complexo de espécies.

Trabalhos recentes com fungos do gênero *Isaria* têm demonstrado eficiência no controle de cupins. Wright, Connick e Jackson (2003) patentearam linhagens das espécies *I. fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize) e *I. javanica* (= *Paecilomyces javanicus*) (Friedrichs & Bally) para o controle de cupins subterrâneos.

Até 1990, poucos registros estavam disponíveis, sobre o uso de espécies do gênero *Isaria* para o controle de pragas de insetos em laboratório, casa de vegetação ou em campo. Os primeiros trabalhos usando *I. farinosa* foram publicadas por Steinhaus (1949) e Müller-

Kögler (1965). Müller-Kögler (1965) menciona testes realizados com o fungo *I. farinosa* contra os insetos *Rhizoecus kondonis* (Hemiptera), *Dendrolimus pini*, *Lymantria dispar*, *Hyloicus pinastri* e *Bupalus piniarius* (Lepidoptera), enquanto a espécie *I. fumosorosea* só foi testada para o controle de *Blepharipoda zebina*. Vários produtos à base de *I. fumosorosea* foram desenvolvidos isoladamente ou em combinação com outras espécies de entomopatógenos, nos EUA, na Europa, Índia e na América do Sul (Colômbia, México e Venezuela) (FARIA; WRAIGHT, 2007; Tabela 1.7).

I. fumosorosea pode ser produzido facilmente por fermentação líquida (JACKSON et al., 1997, JACKSON; CLIQUET; HEM, 2003; VIDAL et al., 1998; MASCARIN et al., 2015). Alguns isolados de *I. fumosorosea* são mais eficazes a um inseto específico, tal como a mosca-branca *Bemisia tabaci*, enquanto outros isolados parecem ser capazes de infectar uma gama ampla de insetos e ácaros (ZIMMERMAN, 2008). A capacidade infectiva também parece variar com o tipo de propágulos. Por exemplo, os pesquisadores Lacey e Mercadier (1998) relataram que blastosporos foram mais eficientes a ninfas de mosca-branca *Bemisia tabaci* em comparação com os conídios. Outros estudos demonstraram diferenças na atividade inseticida com base na duração e velocidade de germinação de esporos (ALTRE; VANDENBERG; CANTONE, 1999).

Tabela 1.7 - Micopesticidas a base de *Isaria fumosorosea* (compilado de BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001; WRAIGHT; JACKSON; KOCK, 2001; FARIA; WRAIGHT 2007). Alguns dos produtos não estão disponíveis comercialmente

Produto	Fabricante / Distribuidor	Cultivo	Alvo de pragas
Ago Biocontrol Paecilomyces 50	Ago Biocontrol, Colômbia	-	Coleoptera, nematôides
Bemisin®	Probioagro, Venezuela	-	Hemiptera (moscas-brancas)
Fumosil®	Productos Biologicos Perkins Ltda, Colômbia	-	Hemiptera (mosca-branca, pulgões, coccídeos), Thysanoptera (tripes)
Micobiol Completo® (mix com <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>N. rileyi</i> , <i>B. thuringiensis</i>)	NI, Colômbia	-	Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Acari
Micobiol® HE (mix com <i>B. bassiana</i> , <i>H. thomsonii</i> , <i>Lecanicillium</i> sp., <i>M. anisopliae</i> , <i>N. rileyi</i> , <i>P. lilacinus</i>)	NI, Colômbia	-	Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Acari, nematôides
Multiplex Mycomite®	Um conjunto de produtos entre the United Planters' Association of southern India (UPASI), the Tea Research Foundation And Multiplex Biotech Pvt. Ltd.	Chá	Ácaro-vermelho-dochá, <i>Oligonychus coffeae</i>
Pae-Sin®	Agrobiologicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa), México	-	Hemiptera (moscas-brancas)
*PFR-97 20% WDG® (Apopka strain 97)	Certis, USA	Plantas ornamentais	Hemiptera (mosca-branca, pulgões), Thysanoptera (tripes), Acari
*PreFeRal WG® (Apopka strain 97)	Biobest Biological Systems, Belgium	Tomate, pepino	Hemiptera (moscas-brancas)
Priority®	T. Stanes & Company, India	Flores de corte, plantas ornamentais, vegetais, milho, arroz, algodão, culturas de cole e plantação de cultivo	Acari (<i>Tetranychus urticae</i> , <i>Panonychus ulmi</i> , <i>Byrobia</i> <i>rubrioculus</i> , <i>Aculus</i> <i>schlectendall</i>)
Successor®	Live Systems Technology S.A. Colômbia	-	Hemiptera (mosca-branca, pulgões), Thysanoptera (tripes), Acari
Tri-Sin® (mix com <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>)	Agrobiologicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa), México	-	Hemiptera (Psyllidae)

*Estes micopesticidas a base de *I. fumosorosea* foram recentemente identificados como *I. javanica* (CABANILLAS et al., 2013).

1.8 Objetivos

- 1.8.1 Caracterizar isolados de *I. fumosorosea* quanto aos parâmetros: produção de conídios, efeitos da radiação UV-B e temperatura alta.
- 1.8.2 Ajustar o ponto de secagem dos conídios de *I. fumosorosea* para incrementar o tempo de prateleira em formulações dispersão oleosa.
- 1.8.3 Determinar a persistência dos conídios de *I. fumosorosea* em formulações do tipo dispersão oleosa.

Referências

- ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; CRUZ, R.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e função do período e condições de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 57-63, 1983.
- AGUDELO, F.; FALCON, L.A. Mass production, infectivity and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 42, p. 124-132, 1983.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. **Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da canade-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae***. São Paulo: Instituto Biológico, 2006. 19 p. (Boletim Técnico).
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Selection of *Beauveria* spp. Isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 121, p. 539-543, 1997.
- ALTRE, J., VANDENBERG, J.; CANTONE, F. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**. San Diego, v. 73, p. 332-338. 1999.
- ALVES, S.B. **Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.** 1982. 95 p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.
- _____. Epizootiologia. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. cap. 4, p. 29-60.
- _____. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998a. cap. 11, p. 289-370.
- _____. Patología e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998b. cap. 1, p. 21-37.
- _____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998c. v. 4, 1163 p.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637-710.

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. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.

ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.

ANDERSON, T.E.; ROBERTS, D.W. Compatibility of *Beauveria bassiana* Isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) Control. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 76, p. 1437-1441, 1983.

AQUINO, M.L.N. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v. 72, p. 1-26, 1974.

AUSIQUE, J.J.S. **Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros**. 2014. 77 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

AVERY, P.B.; J. FAULL, J.; SIMMONDS, M.S. Effects of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Encarsia formosa* on the control of the greenhouse whitefly: preliminary assessment of a compatibility study. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 53, p. 303–316. 2008.

AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; HALL, D.G.; M.A. JACKSON, M.A.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) Infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 92, p. 608–618, 2009.

BATEMAN, R.P.; MATHEWS, G.A.; HALL, F.R. Ground-based application equipment. In: LACEY, LA.; KAYA, H.K. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2007. p. 73-98.

BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, p. 145-152, 1993.

BATISTA FILHO, A.; CARDELLI, M.A. Viabilidade dos esporos de *B. bassiana* (Bals.) Vuill., isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. **Biológico**, São Paulo, v. 52, p. 57-59, 1986.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*; a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 73, p. 140-146, 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 74, p. 734-739, 2001b.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 78, n. 2, p. 98-108. 2001c.

BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, New York, v. 94, p. 912-920, 2002.

BURGES, H.D. Formulation of Mycoinsecticides. In: _____. (Ed.). **Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 131-185.

BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Introduction fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents**. Wallingford: CABI Publ., 2001. p. 18.

CABANILLAS, H.E.; DE LEÓN, J.H.; HUMBER, R.A; MURRAY, K.D.; JONES, W.A. *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. **Mycoscience**, Tokyo, v. 54, p. 158-169, 2013.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konossu Saitama, v. 2, n. 4, p. 119-125, 2001.

CANTONE, F.; VANDENBERG, J. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 2, p. 209-215, 1998.

CLERK, T.C.; MADELIN, M.F. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. **Transactions British Mycological Society**. Cambridge, v. 48, n. 2, p. 193-209, 1965.

CONCESCHI, R.M. **Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros**. 2013. 104 p. Dissertação de (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CONSOLO, V.F.; SALERNO, G.L.; BERON, C.M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 705-712, 2003.

COSTA, C.; COSTA, J.M.; SLAMA, A. Mutational spectrum and DNA-based prenatal diagnosis in camitine-acylcarnitine translocase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, Salt Lake City, v. 78, p. 68-73, 2003.

COPPING, L.G. **The manual of biocontrol agents**. 3rd ed. Hampshire: BCPC Publ., 2004. 896 p.

CHELICO, L.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 93-100, 2008.

DALLEAU-CLOUET, C.; GAUTHIER, N.; RISTERUCCI, M.; BONS, C.; FARGUES, J. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 496-498, 2005.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 151-160, 1983.

DEVI, K.U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, CH.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, p.181-189, 2005.

DÍAZ, M.P.; MACIAS, A.F.; NAVARRO, S.R.; DE LA TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, Caracas, v. 31, p. 12, 2006.

DOBERSKI, J.W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 37, n. 2, p. 195-200, 1981.

DUNLAP, C.; JACKSON, M.; WRIGHT, M. A foam formulation of *Paecilomyces fumosoroseus*, an entomopathogenic biocontrol agent. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 5/6, p. 513-523, 2007.

FARGUES, J.; BON, M.C. Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 87, p. 94-104, 2004.

FARGUES, J.; BON, M.; MAGUIN, S.; COUTEAUDIER, Y. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on rDNA-ITS regions. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 1066-1074, 2002.

FARGUES, J.; MANIANIA, N.K.; DELMAS, J.C.; SMITS, N. Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. **Agronomie**, Paris, v. 12, p. 557-564, 1992.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; SMITS, N.; COUSTERE, C.; ITIER, B. Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-ultraviolet (UVB and UVA) and Visible Radiation, **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 70-78, 1997.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OVEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A. LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 135, p. 71-81. 1996.

FARIA, M.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237-256, 2007.

FARIA, M.; HAJEK, M.A.; WRAIGHT, S.P. Differential tolerance to imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 346-354, 2009.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 22, p. 18-44, 2001.

FENG, M.T.; POPRAWISKI, G.; KHACHATOURIANS, G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 3-34, 1994.

FOURTOUNI, A.; MANETAS, Y.; CHRISTIAS, C. Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 76, p. 2093-2099, 1998.

FRANCISCO, E.A. **Tolerância de bioinseticidas comerciais à base de *Metarhizium anisopliae* à radiação UV-A e UV-B e efeito do tempo de cultivo dos conídios**. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2004.

FRANCO, M.P.J. **Tolerância de conídios às radiações UV-A e UV-B em função do tempo de cultivo de fungos entomopatogênicos**. 2005. 42 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2005.

FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J. L. Viabilidade natural para crescimento, condições e sobrevivência á luz ultra-violeta em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Revista de Agricultura**, Brasil, v. 61, n. 2, p. 137-147, 1986.

GAMS, W.; HODGE, K.T.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. Proposal to conserve the name *Isaria* Pers.: Fr. (anamorphic fungi) with a conserved type. **Taxon**, Utrecht, v. 54, n. 2, p. 537-537. 2005.

- GANDARILLA-PACHECO, F.L.; LÓPEZ-ARROYO, J.I.; GALÁN-WONG, L.J.; QUINTERO-ZAPATA, I. Patogenicidad de hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 38, n. 2, p. 325–337, 2013.
- GAUTHIER, N.; DALLEAU-CLOUET, C.; FARGUES, J.; BON, M. Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. **Mycologia**, New York, v. 99, n. 5, p. 693-704, 2007.
- GILLESPIE, A.T.; CLAYDON, N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. **The Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 27, p. 203–215, 1989.
- GOETTEL, M.S.; ROBERTS, D.W. Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C. (Ed.). **Biological control of locusts and grasshoppers**. Wallingford: CABI International, 1992. p. 230-238.
- GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRIGHT, S.P. Fungi. In: _____. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2000. chap. 4, p. 255-282.
- GRYGANSKI, A.P.; HUMBER, R.A.; SMITH, M.E.; HODGE, K.; HUANG, B.; VOIGT, K.; VILGALYS. Phylogenetic lineages in Entomophthromycota. **Persoonia**, Leiden, v. 30, p. 94-105, 2013.
- HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of grown of entomopatogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, n. 3, p. 261-266, 1999.
- HEGEDUS D.; KHACHATOURIANS, G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, p. 455-490, 1995.
- _____. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerasa chain reaction and single-strand conformation polymorphismanalysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 289-299, 1996.
- HIROSE, E.; NEVES, P.M.O.J.; ZEQUIL, J.A.; MARTINS, C.L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO JR., A. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 44, p. 419-423, 2001.
- HODGE, K.T.; GAMS, W.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. Lectotypification and status of *Isaria* Pers. **Taxon**, Utrecht, v. 52, n. 2, p. 485–489, 2005.
- HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5260-5266, 2005.

HONG, T.D.; JENKINS, N.E.; ELLIS, R.H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 662-665, 2000.

HONG, T.D.; EDGINGTON, S.; ELLIS, R.H.; DE MURO, M.A.; MOORE, D. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 89, p. 136-143, 2005.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 65-71, 2004.

HOY, M.; RAGHUWINDER, S.; ROGERS, M. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 93, n. 1, p. 24-32. 2010.

HUMBER, R.A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 120, p. 477-492, 2012.

HUNT, T.R.; MORRE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride*. **Entomophaga**, Paris, v. 39, n. 4, p. 312-322, 1994.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, London, v. 6, n. 3, p. 411-415, 1977.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 581-590, 1995.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, T.M.; STRASSER, B. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agentes**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 23-69.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L.; GOETTEL, M. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Sympodulosporae) of grasshoppers under field conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 400-409, 1997.

JACKSON, C.W.; HEALE, J.B; HALL, R.A. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 106, p. 39-48, 1985.

JACKSON, M.A.; CLIQUET, S.; ITEN, L.B. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 13, p. 23-33, 2003.

JACKSON, M.A.; MCGUIRE, M.R.; LACEY, L.A.; WRAIGHT, S.P. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 35-41, 1997.

JONES, E.B.G. Fungal adhesión: presidential address 1992. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 961-981, 1994.

JONES, K.A.; BURGESS, H.D. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Formulation of microbial pesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 7-30.

KAWAKAMI, K.; MIKUNI, T. Effects of relative humidity and temperature on the viability of conidia of some muscardines. **Acta Sericologica**, Ibaraki, v. 56, p. 42-46, 1965.

KENDRICK, M. **The fifth kingdom**. 3rd ed. Sidney: Mycologue Publ., 2000. 400 p.

KERSHAW, M.J.; TALBOT, N.J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, p. 18-33, 1998.

KHALIL, S.K.; SHAH, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, p. 329-334, 1985.

KIM, J.S.; JE, Y.H.; ROH, J.Y. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SEP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, p. 419-423, 2010.

KNOWLES, A. Recent developments of safer formulations of agrochemicals. **Environmentalist**, Hampshire, v. 28, p. 35-44, 2008.

LACEY, L.; MERCADIER, G. The effect of selected allelochemicals on germination of conidia and blastospores and mycelia growth of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Mycopathologia**, Den Haag, v. 142, p. 17-25, 1998.

LATGÉ, J.P.; MOLETTA, R. Biotechnology. In: SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, J.P. **Atlas entomopathogenic fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 152-164.

LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 6-12, 2009.

LEACH, C.M. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 43, p. 185-200, 1965.

LEATHERDALE, D. The arthropod host of entomogenous fungi in Britain. **Entomophaga**, Paris, v. 15, n. 4, p. 419-435, 1970.

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

LOPES, R.B. **Seleção de entomopatógenos e controle de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)**. 1999. 72 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

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

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; MANOCH, L.; SAMSON, A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycology Research**, Cambridge, v. 109, n. 5, p. 581-589, 2005.

LUZ, C.; ROCHA, L.F.N.; NERY, G.V.; MAGALHÃES, B.P.; TIGANO, M.S. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo**, Cruz, v. 99, p. 211-218, 2004.

MAGALHÃES, B.P.; BOUEIAS, D.G. Effects of drying on the survival of conidiospores of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner. **Journal of Orthoptera Research**, Philadelphia, v. 13, p. 155-159, 2004.

MANIANIA, N.K.; FARGUES, J. Susceptibility of *Mamestra brassicae* (L.), and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lep. Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brown and Smith) and *Nomuraea rileyi* (Samson) at two temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 113, n. 5, p. 518-524, 1992.

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DELALIBERA, J.I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 127, p. 11–20, 2015.

McCLATCHIE, G.V.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviridae* in oil formulations. **Mycological research**, Cambridge, v. 98, p. 749–756, 1994.

MCCOY, C.W. Factors governing the efficacy of *Hirsutiella thompsonii* in the field. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, D. (Ed.). **Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology**. Wageningen: Society of Invertebrate Pathology, 1986. p. 171-174. MEYER, J.M.; HOY, M.A.; BOUCIAS, D.G. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, p. 96–102, 2008.

MICHEREFF FILHO, M.; RODRIGUES DE FARIA, M.; STEPHEN, P.W. **Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos?** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 28 p. (Documentos, 20).

MIETKIEWSKI, R.; TKACZUK, C.; ZUREK, M.; VAN DER GEEST, L.P.S. Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. **Acta Mycologica**, Warszawa, v. 29, p. 109-120, 1994.

MOINO JÚNIOR, A. **Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok, e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, para o controle de pragas de grãos armazenados.** 1993. 100 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1993.

MOORE, D.; CAUDWELL, R.W. Formulation of entomopathogens for the control of grasshoppers and locust. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 171, p. 49-67, 1997.

MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. **Biocontrol News and Information**, Wallingford, v. 14, p. 31-40, 1993.

MOORE, D.; LANGEWALD, J.; OBOGNON, F. Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* mycopesticide formulations. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, p. 87-94, 1997.

MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O.K.; JENKINS, N.E.; LOMER, C.J. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 51-61, 1996.

MÜLLER-KÖGLER, E. **Pilzkrankheiten bei Insekten:** Anwendung zur biologischen Schadlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Berlin: P. Parey, 1965. 444 p.

NANKINGA, C.M.; MOORE, D. Reduction of banana weevil populations using different formulations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, p. 645-657, 2000.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO JR.A. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoids insecticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 263-268, 2001.

NORRIS, R.F.; CASWELL-CHEN, E.P.; KOGAN, M. **Concepts in integrated pest management.** New Jersey: Prentice Hall, 2003. 586 p.

PADULLA L.F.L.; ALVES S.B. Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungo entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, Sao Paulo, v. 76, p. 297-302, 2009.

PANYASIRI, C.; ATTATHOM, T.; POEHLING, H.M. Pathogenicity of entomopathogenic fungi potential candidates to control insect pests on tomato under protected cultivation in Thailand. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 114, p. 278-287, 2007.

POSADA, F.; VEGA, F.; REHNER, S.; BLACKWELL, M.; WEBER, D.; SUH, S.; HUMBER, R. *Syspastospora parasitica*, a mycoparasite of the fungus *Beauveria bassiana*, attacking the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: a tritrophic association. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 4, p. 24, 2004.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; G. LE PATOUREL. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 52, p. 66-72, 1988.

RANGEL, D.E.N.; BYTLER, M.J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A.J.; BRAGA, G.U.L.; DAY, A.W.; ROBERTS, D.W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 93, n. 3, p. 170- 182, 2006.

ROBERTS, D.W.; FLINT, S.D. Tools of the UV trade light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 2002, Londrina. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 237-240.

ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D.E. the role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 5, p. 510-514, 1985.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, Barn, n. 6, p. 1-119, 1974.

SANTOS, A.L.L. **Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.** 1978. 148 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

SILVA, R.Z.D.A.; NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and in vitro phytosanitary products. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 7, p. 667-674, 2005.

SINGKARAVANIT, S.; KINOSHITA, H.; IHARA, F.; NIHIRA, T. Cloning and functional analysis of the second geranylgeranyl diphosphate synthase gene influencing helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 1077-1088, 2010.

SMITS, N.; FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; ITIER, B. Effects of temperature and solar radiation interactions on the survival of quiescent conidia of the entomopathogenic Hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 135, p. 163-170, 1996.

SMITH, P. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. **Biocontrol News and Information**, Wallingford, v. 14, p. 71-78, 1993.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAVIZAS, C.G. (Ed.) **Biological control in crop production**. New York: Allanheld & Osmun Publ., 1981. p. 161-180.

SOZA GÔMEZ, D.R. **Caracterização e padronização de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 provenientes de diferentes regiões do Brasil.** 1983. 117 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

STEINHAUS, E.A. **Principles of insect pathology.** New York: McGraw-Hill Book, 1949. 757 p.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; SATO, H.; WAGIMAN, F.; TSUYUMYU, S.; FUKATSU, T. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, p. 509–513, 2000.

TAMAI, M.A. **Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch.** 1997. 86 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

TANZINI, M.R. **Controle de percevejo de renda da seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos.** 2002. 140 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TIGANO-MILANI, M.S.; FARIA, M.R.; MARTINS, I.; LECUONA, R.E. Occorência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Paecilomyces* sp. em solos de diferentes regiões do Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, p. 391–393, 1993.

TINLINE, R.D.; C. NOVIELLO. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**. New York, v. 63, p. 701-712, 1971.

VALLE, T.L. **Influência da qualidade da luz no crescimento e esporulação do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** 1984. 78 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

VANDENBERG, J.D.; CANTONE, F.A. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence and host specificity. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 85, p. 40-45, 2004.

VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaeroteca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 99, n. 2, p. 101-103, 1993.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L.A. ‘Intraspecific Variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of Temperature on Vegetative Growth’, **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 70, p. 18-26. 1997.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L.A.; JACKSON, M.A. ‘Effect of Various Liquid Culture Media on Morphology, Growth, Propagule Production, and Pathogenic Activity to *Bemisia argentifolii* of the Entomopathogenic *Paecilomyces fumosoroseus*’, **Mycopathologia**, Den Haag, v. 143, p. 33-46. 1998.

VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 39, n. 1, p. 123-128, 1996.

VILLACORTA, A. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in granular form. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 5, p. 101-104, 1977.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 16, p. 221-226, 1970.

WESSELS, J.G.H. Fungi in their own right. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 134-145, 1999.

WRAIGHT, S.P.; JACKSON, M.A.; KOCK, S.L. de, Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 253-287.

WRIGHT, M.S.; CONNICK, W.J.; JACKSON, M.A. **Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites**. 2003. U.S. Patent 20030095951.

YATIN, B.T.; VENKATARAMAN, N.S.; PARIJA, T.K.; PANNEERSELVAM, D.; GOVINDANAYAGI, P.; GEETHA, K. **The new biopesticide market**. Denver: Business Communications Research, 2006. 168 p.

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**, Sussex, v. 59, p. 156-165, 2003.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. New York, v. 40, n. 1, p. 36-40, 1982.

_____. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology, and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, p. 865-891, 2008.

2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Isaria fumosorosea* QUANTO AOS PARÂMETROS PRODUÇÃO DE CONÍDIOS, EFEITOS DA RADIAÇÃO UV-B E TEMPERATURA ALTA

Resumo

A primeira etapa para o desenvolvimento de biopesticidas à base de fungos entomopatogênicos é a escolha de isolados com elevados rendimentos de conídios na fermentação sólida e tolerantes às condições ambientais adversas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *Isaria fumosorosea* procedentes de diversos biomas do Brasil quanto à produção de conídios, tolerância aos efeitos da radiação ultravioleta (UV-B) e temperatura alta (45°C). A partir de uma coleção de 172 isolados, os 72 melhores foram inicialmente escolhidos visualmente pela esporulação em placa de Petri contendo meio de cultura SDYA (Sabouraud, dextrose, extrato de levedura e ágar). Estes foram produzidos em 50 g de arroz parboilizado em garrafas de vidro por 10 dias de incubação a 26°C com 12 horas de fotofase. Posteriormente, 14 isolados foram selecionados para a fermentação sólida em sacos de polipropileno contendo 180 g de arroz parboilizado em sistema de produção semelhante ao usado industrialmente. Suspensões de conídios (150 µL a 10^6 conídios/mL) de cada isolado foram expostas à radiação UV-B de 659,54 mW/m² por 0, 2, 4, 6 e 8 horas em placas de Petri tipo Rodac contendo 5 mL do meio de cultura BDA Difco + Derosal + Pentabiótico. Nos testes de tolerância à temperatura elevada, as suspensões de conídios foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro estéril, vedados e incubados em banho-maria a 45°C por 30, 60 e 90 minutos com agitação constante. Os isolados ESALQ-4556 e ESALQ-4778 apresentaram os maiores rendimentos de conídios em garrafas de vidro (4,65 e 4,40 × 10⁹ conídios/g arroz seco) e em sacos de polipropileno (3,96 e 3,25 × 10⁹ conídios/g arroz seco). O aumento do período de exposição à radiação UV-B e de aquecimento a 45°C reduziu a germinação de conídios para todos os isolados de *I. fumosorosea*. Os maiores níveis de tolerância foram detectados nos isolados ESALQ-1296, ESALQ-3415. Considerando todos os parâmetros pode se indicar que os isolados ESALQ-4556, ESALQ-1296 e ESALQ-3415 apresentaram um bom desempenho; portanto, são candidatos potenciais para o desenvolvimento de micoinseticidas para o controle de pragas.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Fermentação sólida; Radiação ultravioleta-B; Termotolerância

Abstract

The first step in the development of biopesticides based on entomopathogenic fungi is the selection of isolates with high conidia production in the solid fermentation and tolerant to adverse environmental conditions. The aim of this study was to characterize isolates of *Isaria fumosorosea* from various Brazilian biomes regarding conidia production, tolerance to ultraviolet radiation (UV-B) and high temperature (45°C). Based on a collection of 172 isolates the top 72 were initially selected by visual observations of sporulation in Petri dishes containing SDYA culture medium (Sabouraud dextrose, yeast extract and agar). These isolates were then grown in 50 g of parboiled rice in glass bottles for 10 days incubation at 26°C with 12 hours photoperiod. Subsequently, 14 isolates were selected for the solid fermentation in polypropylene bags containing 180 g dry parboiled rice (=300 g moistened rice) in a production system similar to the industrial scale. Conidia suspensions (150 µL 10^6 conidia/mL) of each isolate were exposed to UV-B radiation of 659.54 mW/m² for 0, 2, 4, 6

and 8 hours in Rodac type dishes containing 5 mL of PDA culture medium Difco + Derosal + antibiotics. In the essays using high temperature, the suspensions of conidia were stored in sterile glass vials, sealed and incubated in a water bath at 45°C for 30, 60 and 90 minutes with constant stirring. The ESALQ-4556 and ESALQ-4778 isolates showed the highest conidia production in glass bottles (4.65 and 4.40×10^9 spores/g dry rice) and polypropylene bags (3.96 and 3.25×10^9 spores/g dry rice). The increase in UV-B radiation and temperature of 45°C reduced the conidia germination for all *I. fumosorosea* isolates. The highest levels of tolerance were found in the isolates ESALQ-1296 and ESALQ-3415. Considering all parameters together the isolates ESALQ-4556, ESALQ-1296 and ESALQ-3415 performed well; therefore, they are potential candidates for the development of mycopesticides for pest control.

Keywords: Entomopathogenic fungi; Solid fermentation; UV-B radiation; Thermotolerance

2.1 Introdução

Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes naturais de controle de insetos, apresentam ampla variabilidade genética dentro de cada espécie, e são patogênicos a um espectro relativamente amplo de insetos hospedeiros. Algumas espécies podem persistir no campo desenvolvendo epizootias e contribuir na regulação de populações de pragas. Devido a estas características, é possível selecionar isolados virulentos e produtivos, por meio de bioensaios em laboratório, características importantes na seleção de microrganismos para serem empregadas como inseticidas microbianos para o controle de pragas (ALVES, 1998).

Segundo Paccola-Meirelles e Azevedo (1990); Kleespies e Zimmermann (1994), a variabilidade genética dos isolados resulta em diferenças na produção de enzimas (amilase, protease, lipase) e toxinas, durante a germinação dos conídios para penetração na cutícula e na colonização dos isolados. Moino Junior (1993) estudou a patogenicidade de 72 isolados do fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae* a três espécies de curculionídeos, pragas de grãos armazenados, obtendo uma grande variação na mortalidade (60 % a 100% de mortalidade).

Os fungos entomopatogênicos ao serem aplicados sob condições de campo estão sujeitos à ação de fatores bióticos e abióticos, que podem influenciar na sua sobrevivência, propagação e infecção no hospedeiro (GOETTEL INGLIS; WRIGHT, 2000). Entre os abióticos, destaque-se a temperatura, umidade e a radiação ultravioleta que podem afetar a sobrevivência dos fungos (ABREU et al., 1983; BATISTA FILHO; CARDELLI, 1986; BRAGA et al., 2001).

Esta diferença de produção de conídios, patogenicidade, virulência e tolerância à radiação ultravioleta entre isolados da mesma espécie também tem sido documentada para os fungos entomopatogênicos, estas características são importantes na seleção de

microrganismos para serem empregadas como inseticidas microbianos para o controle de pragas (JACKSON; HEALE; HALL, 1985; MANIANIA; FARGUES, 1992; ALVES 1998). No mundo, portanto, são comercializados diversos produtos à base de fungos entomopatogênicos, sendo somente 5,8% destes desenvolvidos à base de *I. fumosorosea* segundo levantamento de Faria e Wraight (2007). Essa porcentagem deve ser ainda bem menor se considerarmos que alguns fungos daquele levantamento possam não estar identificados corretamente. Por exemplo, o isolado PFR-97 registrado nos EUA e Europa como *I. fumosorosea*, deve ser tratar de *I. javanica* segundo estudo de Cabanillas et al. (2013).

No Brasil, não existe nenhum produto registrado à base de *Isaria* e poucos estudos foram feitos com espécies deste gênero de fungo. Entretanto, há uma demanda crescente para o desenvolvimento de biopesticidas à base de *I. fumosorosea*, especialmente para o controle de mosca-branca, *Bemisia tabaci*, e do psíldeo-dos-citros, *Diaphorina citri*, vetor da doença conhecida como “Greening dos citros” ou Huanglongbing. Este trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *I. fumosorosea* quanto aos parâmetros, produção de conídios, efeitos da radiação UV-B e temperatura alta para o desenvolvimento de biopesticidas com potencial para o manejo integrado de pragas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Seleção de isolados de *I. fumosorosea* em meio de cultura

O trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Pragas do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ- USP (Piracicaba, SP). Foram utilizados 172 isolados do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea*, provenientes da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba – SP (Anexo A). Exceto, pelos isolados ESALQ-1296 e ESALQ-1409 provenientes de insetos infectados naturalmente em campo, todos os outros foram oriundos de amostras de solo, seja por meio seletivo ou pelo método insect bait. Os isolados fúngicos foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose enriquecido com extrato de levedura (SDYA: 2,5 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica, 10 g.L⁻¹ de dextrose, 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura), e mantidos por 10 dias em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand), a 26 ± 1°C e 12 horas de fotofase. Depois de 10 dias, os isolados que apresentaram maior esporulação foram selecionados para produção em grão de arroz, teste de tolerância a UV-B e termotolerância à temperatura de 45°C.

2.2.2 Produção de *I. fumosorosea* por fermentação sólida em frascos de vidro

O rendimento de conídios em grãos de arroz foi avaliado em 72 isolados de *I. fumosorosea* após seleção em meio de cultura SDYA. A fermentação sólida foi conduzida em frascos de vidro borossilicato, graduados, com tampa rosqueável (Schott) e capacidade de 250 mL. Este método de produção foi utilizado, pois permite uma maior padronização e um menor espaço para crescimento de um grande número de amostras quando comparado a outros métodos como em sacos plásticos, bandejas, etc. Foram transferidos para cada frasco 50 gramas de arroz parboilizado tipo 1 e 100 mL de água destilada. Todos os frascos foram mantidos a temperatura ambiente por 50 minutos para favorecer a hidratação do substrato e, posteriormente, o arroz foi peneirado para remover o excesso de água e o arroz retornado para os frascos. Os frascos foram esterilizados numa autoclave a 120°C por 20 minutos e transferidos para uma sala asséptica até esfriar o arroz.

O inóculo de cada isolado selecionado foi preparado por raspagem dos conídios presentes no meio de cultura SDYA sólido e diluído em água destilada estéril com espalhante adesivo (Tween 80) 0,05%. A inoculação dos frascos foi feita em uma câmara asséptica de fluxo laminar com a adição de 5 mL da suspensão de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ de cada isolado. Após a inoculação, todos os frascos foram mantidos por 10 dias em uma B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase (Figura 2.1).

Para a quantificação do rendimento de conídios de cada isolado, foram adicionados 150 mL de água destilada estéril mais (0,05% Tween 80 por tubo e os recipientes foram agitados manualmente por 5 minutos, e em seguida colocados em uma mesa agitadora orbital (Modelo: MA 140 CFT, Marconi), programada para 300 rotações por minuto, onde permaneceram por 30 minutos. Após a remoção dos conídios do substrato, diluições sucessivas foram realizadas até ajustar a concentração dos conídios para que pudessem ser quantificados sob uma câmara de Neubauer em microscópio com contraste de fase (400x ampliação). O número de conídios.grama⁻¹ de arroz foi determinado de acordo com Alves, Moino e Almeida (1998). Foram utilizadas quatro repetições por isolado, totalizando 288 frascos de vidros.

Figura 2.1 - Frascos de vidros com arroz + fungo mantidos por 10 dias em uma B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase

2.2.3 Produção de *I. fumosorosea* na fermentação sólida em sacolas plásticas

Após a produção dos isolados em frascos de vidro, foram selecionados os 10 isolados que apresentaram as maiores produções de conídios, os três isolados com menores produções de conídios e o isolado ESALQ-1296 (escolhido por ser proveniente de inseto), para produção em sistema semelhante ao usado industrialmente pela maioria das empresas e usinas produtoras de fungos entomopatogênicos no Brasil. Esses 14 isolados foram usados para produção em sacos de polipropileno preenchidos com 180 gramas de arroz parboilizado tipo 1 seco. Em cada saco foram colocados 360 mL de água destilada e mantidos à temperatura ambiente por 50 minutos para hidratação do substrato. Após este período, o arroz foi peneirado para remover o excesso de água e retornado para as sacolas (aproximadamente 300 g de arroz hidratado). As sacolas foram esterilizadas numa autoclave a 120°C por 20 minutos e transferidos para uma sala até esfriar o arroz. Posteriormente, as sacolas foram inoculadas com 10 mL de uma suspensão de 1×10^7 conídios mL^{-1} em câmara asséptica de fluxo laminar. Os sacos plásticos foram agitados vigorosamente para obter uma distribuição uniforme dos propágulos fúngicos no substrato, e armazenados em uma B.O.D a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase. Após 10 dias, foram adicionados 540 mL de água destilada estéril mais 0,05% de espalhante adesivo (Tween 80) nas sacolas contendo arroz colonizado pelos fungos (Figura 2.2). Para desprender os conídios do substrato, as sacolas foram agitadas manualmente por 5 minutos e o conteúdo foi transferido para recipientes de vidro com tampa e em seguida colocados em uma mesa agitadora orbital (Modelo: MA 140 CFT, Marconi), programada para 300 rotações por minuto, onde permaneceram por 30 minutos. Para determinar o rendimento de conídios foi coletado 1 mL da suspensão de conídios de cada sacola e adicionando-se a tubos de vidro contendo 9 mL de água destilada estéril mais 0,05% Tween 80, para a

preparação de diluições sucessivas. A concentração dos conídios foi quantificada em uma câmara de Neubauer em microscópio com contraste de fase (400x ampliação). Foram utilizadas três repetições por isolado fúngico e o experimento foi montado duas vezes no tempo.

Figura 2.2 - (A) Crescimento do fungo *I. fumosorosea* em sacolas com arroz e (B) sacolas com arroz + fungo esporulado

2.2.4 Teste de efeitos aos raios ultravioletas sobre os conídios do fungo *I. fumosorosea*

Os testes de tolerância à luz UV-B foram realizados em uma caixa de madeira contendo quatro lâmpadas fluorescentes UVB-313EL da Q-Lab Corporation (EUA) (Figura 2.3), as quais apresentam o máximo de irradiação no comprimento de onda de 313 nm (correspondente à luz UV-B) com um valor meio de irradiação de 659,54 mW/m² e 2,38 KJ/h.

Os 14 isolados de *I. fumosorosea* utilizados na produção de conídios em sacos plásticos foram multiplicados em meio de cultura SDYA de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1. Os conídios foram removidos do meio de cultura por raspagem com uma espátula metálica e diluído em água destilada estéril com 0,05% Tween 80 até ajustar a concentração a 1×10^6 conídios.mL⁻¹. As suspensões fúngicas (150 µL) foram aplicadas no centro de uma placa de Petri tipo Rodac (Figura 2.3) contendo 5 mL do meio de cultura BDA (Difco) mais o produto fungistático Derosal na concentração de 1 mL/L e Pentabiótico 5 mg/mL. Em cada experimento foi preparada uma placa de Petri para cada isolado e tempo de exposição. As lâmpadas fluorescentes foram acionadas 30 minutos antes da exposição, e após este período as placas foram colocadas dentro da caixa de madeira e expostas à radiação UV-B por 8 horas de acordo com a metodologia de Costa et al. (2013). Na parte superior das placas, foi colocado um filtro de acetato para uniformização da radiação e o espectro de radiação reduzido para somente radiação UV-B e parte da UV-A (290–400 nm). As placas foram retiradas em intervalos de 2 horas e, posteriormente, acondicionadas em B.O.D. a

26°C, 12 horas de fotofase durante 48 horas para permitir a recuperação e germinação dos conídios. O tratamento controle consistiu de placas de Petri tipo RODAC contendo a suspensão fúngica de cada isolado sem exposição à radiação UV-B. A germinação desse tratamento foi quantificada após 24 horas de incubação em BOD a 26°C e 12 horas de fotofase. A contagem direta do número de conídios germinados e não germinados foi realizada em microscópio de luz (400x), contando-se no mínimo 200 conídios por placa. Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo com tamanho igual ou superior a duas vezes o diâmetro dos mesmos (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998). O experimento foi repetido quatro vezes no tempo. Os tempos de exposição e o nível de irradiação á luz UV-B foram:

T1: sem exposição à luz UV-B (controle);

T2: 2 horas de exposição (4,76 Kilojoule);

T3: 4 horas (9,52 Kilojoule);

T4: 6 horas (14,286 Kilojoule);

T5: 8 horas (19,04 Kilojoule).

Figura 2.3 - Testes de efeitos aos raios UV-B. (A) Caixa de madeira contendo quatro lâmpadas fluorescentes e (B) placas de Petri tipo RODAC contendo as suspensões fúngicas dos isolados de *I. fumosorosea*

2.2.5 Teste de efeito da temperatura a 45°C

Inicialmente, os 14 isolados de *I. fumosorosea* usados nos ensaios de radiação UV-B foram multiplicados em meio de cultura SDYA de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1. O inóculo de cada isolado selecionado foi preparado por raspagem dos conídios do meio e diluído em água destilada estéril com 0,05% Tween 80 até ajustar a concentração a 1×10^6 conídios mL^{-1} . As suspensões fúngicas foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro

(2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) esterilizados e vedados com filme plástico. Todos os tubos foram incubados em banho-maria (modelo NT249, marca Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a 45°C por 30, 60 e 90 minutos e agitação constante (Figura 2.4). Para cada tratamento foi utilizado um tubo de ensaio contendo 10 mL da suspensão de conídios de cada isolado de *I. fumosorosea*. Em cada tempo, foram coletados 150 µL de cada suspensão fungica e aplicados no centro de uma placa de Petri tipo RODAC contendo 5 mL do meio de cultura BDA (Difco) mais Derosal 1 mL.L⁻¹ e Pentabiótico 5 mg.mL⁻¹. Posteriormente, as placas de Petri foram acondicionadas em B.O.D. a 26°C, 12 horas de fotofase durante 48 horas para permitir a recuperação e germinação dos conídios. O tratamento controle consistiu de placas contendo a suspensão fúngica de cada isolado sem aquecimento. A germinação deste tratamento foi quantificada após 24 horas de incubação em BOD a 26°C e 12 horas de fotofase. A porcentagem de germinação foi determinada contando-se no mínimo 200 conídios por placa em microscópio de luz (400x). Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo com tamanho igual ou superior a duas vezes o diâmetro dos mesmos (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998). O experimento foi repetido cinco vezes no tempo para obter o número de repetições representativas para as análises estatísticas. Os tempos de exposição foram:

T1: controle mantido em temperatura ambiente (sem aquecimento);

T2: 30 minutos de exposição a 45°C;

T3: 60 minutos de exposição a 45°C;

T4: 90 minutos de exposição a 45°C.

Figura 2.4 - Testes de efeito da temperatura a 45°C dos conídios de *I. fumosorosea*. (A) Tubos de ensaio de vidro com a suspensão fungica e (B) banho maria

2.2.6 Análises estatísticas

Os dados de produção de conídios em frascos de vidro foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%, enquanto que os dados de produção de conídios em sacos plásticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), após transformação por $\sqrt{x+0,5}$.

Para os testes de radiação ultravioleta e temperatura, utilizaram modelos lineares generalizados (MLG), por permitirem a análise de dados não normais e distribuição não exponencial (NELDER; WEDDERBURN, 1972). O modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo binomial-normal com função de ligação-logito para os diferentes tempos de exposição e o teste de razão de verossimilhança para modelos encaixados (DEMÉTRIO et al. 2014). As análises dos dados foram conduzidas no programa estatístico R Development Core Team (2014).

2.3 Resultados

2.3.1 Seleção de isolados de *I. fumosorosea* quanto aos parâmetros produção de conídios, efeitos da radiação UV-B e temperatura alta

2.3.1.1 Seleção de isolados de *I. fumosorosea* em meio de cultura

Os isolados apresentaram uma grande diversidade de cores e morfologia de colônias em placas de Petri contendo meio de cultura SDYA. De um total de 172 isolados plaqueados foram selecionados 72 isolados por apresentar visualmente maior esporulação, geralmente aqueles com tonalidades mais escuras. Isolados com grande crescimento micelial (coloração clara) e pouca esporulação não foram selecionados (Figura 2.5).

2.3.1.2 Produção do fungo na fermentação sólida em frascos de vidro

A produção de conídios em grãos de arroz em frascos de vidro apresentou diferenças significativas (p -valor $< 0,001$) sendo os isolados ESALQ-4556 ($4,65 \pm 2,37 \times 10^9$ conídios/g) e ESALQ-4778 ($4,40 \pm 2,76 \times 10^9$ conídios/g) mais produtivos do que ESALQ-1783, ESALQ-1941, ESALQ-2024, ESALQ-3307, ESALQ-1409, ESALQ-1609 e ESALQ-2667. O isolado ESALQ-1998 foi superior a ESALQ-1941, ESALQ-2024, ESALQ-3307, ESALQ-1409, ESALQ-1609, ESALQ-2667. O isolado ESALQ-2778 foi superior a ESALQ-3307, ESALQ-1409, ESALQ-1609 e ESALQ-2667. Já os isolados ESALQ-3300 e ESALQ-3422 foram mais produtivos somente do que ESALQ-2667 ($1,92 \pm 3,16 \times 10^7$ conídios/g) (Figura 2.6). O restante das comparações não foi significativamente diferente. O isolado ESALQ-4556 produziu 12,5 vezes o número de conídios do isolado ESALQ-1755, mas não foram estatisticamente diferentes devido a grande variância dos dados dentre os isolados ESALQ-4556 até ESALQ-1819.

Figura 2.6 - Produção de conídios em grão de arroz dos 72 isolados de *Isaria fumosorosea* em frascos de vidro

2.3.1.3 Produção do fungo na fermentação sólida em sacolas plásticas

A produção de conídios de *I. fumosorosea* em sacos plásticos apresentou a mesma tendência dos valores obtidos em frascos de vidro com menores volumes de arroz e condições mais controladas (Figura 2.7). Ou seja, foi confirmada a tendência da superioridade do isolado ESALQ-4556 ($3,96 \pm 3,27 \times 10^9$ conídios/g) em relação a todos os outros isolados com exceção do isolado ESALQ-4778 ($3,25 \pm 3,55 \times 10^9$ conídios/g). Os isolados ESALQ-2778, ESALQ-3422, ESALQ-1741, ESALQ-3415, ESALQ-1998, ESALQ-3430, ESALQ-3302 apresentaram um rendimento médio que variou de $2,26$ a $2,02 \pm 1,81 \times 10^9$ conídios/g. Os isolados menos produtivos foram ESALQ-3300, ESALQ-1609, ESALQ-2667 e ESALQ-3307.

Figura 2.7 - Produção de conídios de isolados de *Isaria fumosorosea* após 10 dias de incubação a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas

2.3.1.4 Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação dos conídios de *I. fumosorosea*

Verificou-se pelas curvas estimadas (Figura 2.8) que alguns isolados apresentaram comportamento semelhante e, portanto, foram ajustados diversos agrupamentos por meio do teste da razão de verossimilhanças. A melhor forma de agrupamento separou os isolados fúngicos em quatro grupos significativamente diferentes a um nível de 5% de significância. O isolado mais tolerante foi ESALQ-1296 (Grupo 1) com 68,5% de germinação após 8 horas de exposição a radiação UV-B. O Grupo 2 foi constituído pelos isolados ESALQ-3422, ESALQ-

1998 ESALQ-1741, ESALQ-2778, ESALQ-3430 e ESALQ-3415 com porcentagens de germinação que variaram de 60,6% a 17,5% após 8 horas de exposição. Os isolados do Grupo 3 formado por ESALQ-4778, ESALQ-1609, ESALQ-3300, ESALQ-2667, ESALQ-4556 e ESALQ-3302 apresentaram menores valores de germinação quando exposto a radiação UV-B (37,0% a 6,09%) após o mesmo período de exposição. O isolado ESALQ-3307 (Grupo 4) foi o mais sensível apresentando uma notável redução na germinação dos conídios já a partir das 2 horas de exposição e resultando em somente 3,1% de germinação após 8 horas.

Figura 2.8 - Efeito da radiação UV-B sobre a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* seguindo o modelo binomial-normal com função de ligação- logito

Para cada isolado foi ajustado o tempo de exposição que reduziu a germinação dos conídios para 90, 75 e 50% (Tabela 2.1). O isolado mais tolerante (ESALQ-1296) apresentou um tempo médio de redução de 50% da viabilidade de 9,07 horas em comparação com o isolado mais suscetível (ESALQ-3307) que foi de 5,42 horas. Esses valores poderiam ser utilizados como índice de tolerância dos isolados fúngicos à radiação solar no campo indicando que, o isolado ESALQ-1296 poderia ficar exposto a mais 19,04KJ de radiação UV-B e ainda ter 50% de conídios viáveis. Entre tanto, o isolado mais susceptível (ESALQ-3307) poderia receber uma intensidade de luz UV-B de 9,52 KJ com 50% de conídios viáveis. Interessante que o isolado mais tolerante (ESALQ-1296) é o único usado neste estudo que foi

proveniente de inseto infectado na parte aérea de planta (mosca branca, *Bemisia tabaci*) sendo os demais provenientes de solo.

Os isolados fúngicos com maior rendimento de conídios (ESALQ-4556 e ESALQ-4778) foram classificados no Grupo 3. Já o isolado ESALQ-3307 que apresentou o menor rendimento de conídios foi o mais suscetível a radiação UV-B, sugerindo que não deve haver uma relação entre a produção de conídios e a tolerância à radiação UV-B.

Tabela 2.1 - Tempo de exposição à radiação (horas) UV-B que reduziu a germinação dos conídios de *Isaria fumosorosea* a 90%, 75% e 50%

Isolados	90% de germinação		75% de germinação		50% de germinação	
	Estimativa	IC* (95%)	Estimativa	IC* (95%)	Estimativa	IC* (95%)
ESALQ-1296	6,62	(5,11; 8,14)	7,85	(6,33; 9,36)	9,07	(7,56; 10,58)
ESALQ-3422	5,26	(3,86; 6,65)	6,48	(5,09; 7,88)	7,71	(6,31; 9,10)
ESALQ-1998	5,13	(3,75; 6,51)	6,36	(4,97; 7,74)	7,58	(6,20; 8,96)
ESALQ-1741	5,07	(3,67; 6,46)	6,29	(4,89; 7,69)	7,51	(6,12; 8,91)
ESALQ-2778	5,06	(3,67; 6,46)	6,29	(4,89; 7,68)	7,51	(6,11; 8,91)
ESALQ-3430	5,03	(3,60; 6,46)	6,25	(4,82; 7,68)	7,47	(6,04; 8,90)
ESALQ-3415	4,97	(3,59; 6,35)	6,19	(4,81; 7,57)	7,42	(6,03; 8,80)
ESALQ-4778	4,44	(3,08; 5,80)	5,67	(4,31; 7,03)	6,89	(5,53; 8,25)
ESALQ-1609	4,03	(2,69; 5,37)	5,25	(3,91; 6,59)	6,48	(5,14; 7,81)
ESALQ-3300	3,93	(2,55; 5,31)	5,15	(3,77; 6,53)	6,37	(4,99; 7,75)
ESALQ-2667	3,79	(2,46; 5,12)	5,01	(3,68; 6,34)	6,24	(4,91; 7,57)
ESALQ-4556	3,76	(2,45; 5,08)	4,99	(3,67; 6,30)	6,21	(4,90; 7,53)
ESALQ-3302	3,69	(2,38; 5,00)	4,91	(3,60; 6,22)	6,14	(4,83; 7,45)
ESALQ-3307	2,97	(1,65; 4,30)	4,20	(2,87; 5,52)	5,42	(4,09; 6,75)

*IC = Intervalo de confiança

2.3.1.5 Teste de termotolerância a 45°C

As curvas estimadas para cada isolado fúngico são representadas na Figura 2.9 podendo se observar que todos os isolados de *I. fumosorosea* apresentaram uma rápida redução na germinação nos primeiros 30 minutos de exposição a 45°C.

Figura 2.9 - Efeito da incubação a 45°C sobre a germinação dos conídios de *I. fumosorosea*

De acordo com o comportamento semelhante dos isolados de *I. fumosorosea* (proximidade entre as curvas), foram testados diversos agrupamentos por meio do teste da razão de verossimilhanças e os isolados fúngicos foram agrupados em três grupos significativamente diferentes a um nível de 5% de significância. Os isolados ESALQ-1296 e ESALQ-3415 (Grupo 1) foram os mais resistentes à exposição a 45°C por 30 minutos, obtendo valores de viabilidade de 64,6% e 55,2%, respectivamente. Os isolados ESALQ-1741, ESALQ-2778, ESALQ-3430, ESALQ-1998, ESALQ-4778, ESALQ-3302, ESALQ-3300, ESALQ-3422, ESALQ-1609, ESALQ-4556 e ESALQ-2667 foram classificados no Grupo 2 e apresentaram valores de germinação que variaram de 54,6% a 27,8%. O isolado ESALQ-3307 (Grupo 3) foi o mais susceptível ao aquecimento a 45°C com 22,7% de germinação após 30 minutos.

Para cada isolado foi ajustado o tempo de exposição que resultou em germinação dos conídios de 90, 75 e 50% (Tabela 2.2). O tempo de aquecimento que resulta em uma perda de 50% de viabilidade variou de 21,5 h para 38,4 h para os isolados ESALQ-3307 e ESALQ-1296, respectivamente.

Tabela 2.2 - Tempo de incubação (minutos) a 45°C que reduziu a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* a 90%, 75% e 50%

Isolados	90% de germinação		75% de germinação		50% de germinação	
	Estimativa	IC (95%)	Estimativa	IC (95%)	Estimativa	IC (95%)
ESALQ-1296	23,07	(15,52; 30,63)	30,75	(23,19; 38,31)	38,43	(30,87; 45,99)
ESALQ-3415	19,26	(12,41; 26,12)	26,94	(20,08; 33,79)	34,61	(27,76; 41,47)
ESALQ-1741	16,73	(10,21; 23,25)	24,40	(17,88; 30,92)	32,08	(25,56; 38,60)
ESALQ-2778	16,31	(9,90; 22,72)	23,98	(17,57; 30,39)	31,66	(25,25; 38,07)
ESALQ-3430	16,19	(9,61; 22,77)	23,86	(17,28; 30,44)	31,54	(24,96; 38,12)
ESALQ-1998	15,14	(8,93; 21,35)	22,82	(16,61; 29,03)	30,49	(24,28; 36,70)
ESALQ-4778	14,86	(8,43; 21,29)	22,54	(16,10; 28,97)	30,21	(23,78; 36,65)
ESALQ-3302	13,23	(6,90; 19,55)	20,90	(14,58; 27,23)	28,58	(22,25; 34,90)
ESALQ-3300	12,88	(6,54; 19,21)	20,55	(14,22; 26,88)	28,23	(21,90; 34,56)
ESALQ-3422	12,17	(6,10; 18,24)	19,84	(13,77; 25,92)	27,52	(21,45; 33,59)
ESALQ-1609	11,51	(5,46; 17,56)	19,19	(13,14; 25,24)	26,87	(20,82; 32,92)
ESALQ-4556	11,04	(4,85; 17,23)	18,72	(12,53; 24,90)	26,39	(20,21; 32,58)
ESALQ-2667	10,54	(4,49; 16,59)	18,22	(12,17; 24,27)	25,89	(19,85; 31,94)
ESALQ-3307	6,15	(0,53; 11,78)	13,83	(8,20; 19,46)	21,51	(15,88; 27,13)

*IC = Intervalo de confiança

2.4 Discussão

O rendimento de conídios é um fator importante na seleção de isolados, pois pode viabilizar comercialmente um produto pelo menor custo de produção para o controle de pragas (ALVES, 1998). A fermentação sólida do fungo *I. fumosorosea* já foi estudada por outros pesquisadores, entretanto, comparações não podem ser feitas diretamente devido às variações nas metodologias utilizadas, como tipo de arroz, método de produção, mas especialmente quanto à forma de apresentação do rendimento de conídios. Neste estudo, apresentamos os valores de conídios produzidos por grama de arroz seco medido no início da produção antes da hidratação e autoclavagem. Na maioria dos estudos, utiliza-se o rendimento de conídios por grama de arroz úmido ao final da produção, e como existe uma grande variação na umidade do grão de arroz em função das condições de fermentação e perda de água ao final da produção e antes da contagem, se tornam difíceis as comparações com estes estudos. Estudos conduzidos por Silva et al. (2012) sobre a seleção de isolados de *I. fumosorosea* para o controle do percevejo-de-renda revelaram que a produção de conídios foi de $1,39 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, mas esse resultado não é possível ser comparado com nossos resultados por que está expressado em conídios por mL. Murillo-Alonso et al. (2015) observaram que a produção de conídios do fungo *I. fumosorosea* foi de $5,33 \times 10^9$ conídios/g

em arroz. Mascarin, Alves e Lopes (2010) estudaram a produção de conídios dos fungos *I. fumosorosea* (ESALQ-1296) e *I. farinosa* (ESALQ-1205) e reportaram resultados inferiores aos encontrados neste estudo, obtendo um rendimento de $1,1 \times 10^9$ e $1,3 \times 10^9$ conídios/g, respectivamente.

Os resultados obtidos na produção de conídios em sacos de polipropileno foram inferiores do que a produção em frascos de vidro (item 2.3.1.2), o qual é devido possivelmente pelas diferenças nas condições de fermentação sólida e a menor aeração que apresentaram em relação aos frascos de vidro. Resultados semelhantes foram observados por Alves e Pereira (1986) onde relataram que a produção do fungo *M. anisopliae* variou entre 6 e 11,4% do rendimento de conídios em bandejas comparadas com a produção em frascos que atingiu até 12%. Observando-se que em escala industrial o rendimento médio foi de 9% para a produção de conídios desse fungo utilizando o método de bandeja (ALVES; PEREIRA, 1998).

Tanzini (2002) testou dois métodos de produção de conídios, em bandejas e caixas, e observou que *I. fumosorosea* produziu 70% a mais no método de caixa do que na bandeja, chegando a ser 15% mais produtivas do que *B. bassiana*. Nesse caso, o método da caixa proporcionou um melhor ambiente de umidade e aeração para o crescimento *I. fumosorosea*, que poderia ser responsável pela sua maior produção de conídios comparadas com os outros fungos. De acordo com as afirmações de Mascarin e Quintela (2013), a aeração dentro dos sacos de plásticos é um fator importante para a produção em escala industrial, já que os fungos entomopatogênicos são aeróbicos e demandam muito oxigênio para um bom desenvolvimento e esporulação.

Os fungos entomopatogênicos estão sujeitos a fatores bióticos e abióticos que influenciam sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (ALVES, 1998). Entre os fatores abióticos, a radiação solar é a mais importante, pois a luz ultravioleta pode inativar os conídios, provocar danos letais ao DNA e mutações (NICHOLSON et al., 2000; FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001). De acordo com Braga et al. (2002), a maioria dos microrganismos não possui proteção contra os efeitos deletérios da luz solar, incluindo os fungos entomopatogênicos (BENZ, 1987). Os resultados de nosso estudo indicaram claramente que há variabilidade na susceptibilidade dos isolados fúngicos exposto à radiação UV-B. Portanto, na seleção de isolados para o desenvolvimento de agentes de controle microbiano, além da seleção de isolados virulentos e com altas produções de conídios, também devem ser selecionados pela resistência à radiação ultravioleta, com objetivo de aumentar a persistência do fungo no meio ambiente do campo. Da mesma forma, os

microrganismos não possuem mecanismos biológicos para se defender das grandes variações de temperatura (ALVES; LEUCONA, 1998). Esse fator, atuando direta ou indiretamente, pode ser limitante para a maioria dos entomopatógenos porque afeta seu metabolismo, alterando os processos de produção de enzimas, toxinas e germinação dos conídios.

A suscetibilidade dos fungos entomopatogênicos à radiação UV-B varia entre diferentes isolados da mesma espécie e entre espécies diferentes, como foi reportado por Fernandes et al. (2007) onde foi avaliada a resistência à UV-B entre isolados de *B. bassiana* expostos a uma fonte artificial de radiação. Os pesquisadores relataram que aparentemente, o grau de resistência à radiação ultravioleta está associado à origem geográfica dos isolados, já que isolados oriundos de latitudes mais baixas apresentaram menor suscetibilidade à exposição (BRAGA et al., 2001). Além disso, Fargues et al. (1996) relataram que os isolados de *M. flavoviride* foram os mais resistentes seguidos por *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo que os conídios de *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) foram os mais susceptíveis à exposição por 2 h contínuas à luz solar simulada.

O efeito prejudicial da radiação solar depende principalmente do tipo de radiação ultravioleta e a quantidade recebida pelos isolados fúngicos. Fargues et al. (1997) demonstraram que os conídios de *I. fumosorosea* são altamente suscetíveis à radiação UV-B (280 - 320 nm) sendo a radiação mais deletéria da luz solar, embora a radiação UV-A (320 - 400 nm) também seja perigosa. Resultados semelhantes foram encontrados por Fargues et al. (1996) que demonstraram uma diminuição acentuada da sobrevivência dos isolados de *I. fumosorosea* após 4 horas de irradiação de 295-1100 nm a 25°C e 40% UR.

Os resultados apresentados neste estudo, mostraram a grande variabilidade na tolerância de UV-B, entre os 14 isolados testados de *I. fumosorosea*, encontrando-se que a viabilidade variou de 82,38 – 98,65% após 4 horas de irradiação de 313 nm = 0,6 Wm⁻² UV-B. Esses resultados divergem dos encontrados por Fargues et al. (1996) que observaram que exposição à luz solar simulada a 295 nm = 0,3 Wm⁻² UV-B, resultou em sobrevivência dos conídios de 33 isolados de *I. fumosorosea* 0,96% - 0,05% de viabilidade após 4 h de irradiação. Ademais observaram que os isolados *I. fumosorosea* das regiões tropicais eram mais resistentes à radiação de um simulador solar do que os isolados de regiões temperadas.

Ao comparar a susceptibilidade ao calor e aos efeitos da radiação UV-B dos isolados fúngicos com a origem observa-se que os isolados mais tolerantes (ESALQ-1296 e ESALQ-3415) provenientes de mosca-branca, *Bemisia tabaci* e solo de plantação de citros, seguido dos isolados menos tolerantes classificados no Grupo 2 provenientes de diferentes biomas, Caatinga, Amazônia, Mata Atlântica e Pampa, sendo o último bioma caracterizado por

temperaturas mais amenas que os demais. O isolado menos termotolerante (ESALQ-3307) foi proveniente do bioma Caatinga, região caracterizada por temperaturas mais altas. Da mesma forma, o rendimento de conídios não esteve correlacionado à tolerância ao calor e radiação UV-B. O isolado ESALQ-3307 apresentou o menor rendimento de conídios e foi o mais suscetível aos dois efeitos da temperatura e radiação UV-B. Diferentemente, Vidal, Fargues e Lacey (1997) encontraram isolados de *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) de climas mais quentes, com maior tolerância ao calor, do que os isolados de climas mais frios. Bidochka et al. (2001); Braga et al. (2001) e Rangel et al. (2005) demonstraram que isolados testados de *M. anisopliae* tolerantes ao calor foram também tolerantes aos raios UV-B. Observaram também que os isolados coletados em ambiente agrícola foram mais tolerantes ao calor e aos raios UV-B do que os isolados coletados de florestais naturais em regiões frias. Tal fato foi também observado por Rangel et al. (2005), que demonstrou que isolados do fungo *M. anisopliae* coletados de latitudes mais altas demonstraram menor tolerância ao calor do que isolados oriundo de regiões próximas a linha do equador.

A termotolerância dos conídios de fungos entomopatogênicos varia entre isolados da mesma espécie e entre espécies diferentes, sendo demonstrado que os fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. robertsii* e *M. anisopliae* são mais tolerantes às altas temperaturas que o fungo *I. fumosorosea* (FERNANDES et al., 2010; LI; FENG, 2009; RANGEL et al., 2005; SOUZA et al., 2014). Estudos conduzidos por Fernandes et al. (2008), relataram que existe uma alta variabilidade na termotolerância dos isolados de *Beauveria* spp., após 2 horas de exposição a 45°C obtendo diferentes índices de germinação: baixo (0-20%), médio (20-60%) e alta (60-80%). Resultados semelhantes foram observados por Xie et al. (2014) onde foram testados isolados de *I. fumosorosea* para o controle de *Plutella xylostella*. A germinação dos conídios exposto a altas temperaturas (40°, 45°, 50° e 55°C) durante 10 minutos variou de 0,8% a 86% de viabilidade, sendo menos afetada pela exposição a 45°C após 10 minutos. Os pesquisadores Souza et al. (2014) avaliaram a termotolerância dos fungos *I. fumosorosea*, *B. bassiana*, *M. robertsii* e *M. anisopliae* a temperaturas de 38°, 41° e 45°C. Os resultados mostraram que *I. fumosorosea* teve a menor termotolerância ($TL_{50} = 2,06$ h) após a exposição de 41°C. Resultados superiores foram encontrados com os conídios de *B. bassiana* expostos a 45°C ($TL_{50} = 3,5$ h) do que os conídios de *M. robertsii* ($TL_{50} = 2,8$ h) e *M. anisopliae* ($TL_{50} = 2,5$ h). Entretanto, Varela e Morales (1996) descreveram que a porcentagem de germinação dos conídios de *B. bassiana* variou de 10% a 20% quando mantidos a 50°C e 80% a 90% quando mantidos a 45°C durante 10 minutos. Os resultados para os isolados ESALQ-3307 e ESALQ-1296 concordam com os obtidos nesses trabalhos,

com valores estimados de exposição a 45°C para atingir 90% de germinação próxima a 10 minutos.

A tolerância a altas temperaturas foi relacionada à hidrofobicidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos (KIM et al., 2010; YING; FENG, 2004), onde os isolados de *B. bassiana* apresentaram quantidades maiores de proteínas hidrofóbicas e, conseqüentemente, tinham maior termotolerância do que o fungo *I. fumosorosea* com menor quantidade desta proteína (YING; FENG, 2004). Ademais, Kim, Je e Roh (2010) constataram que os conídios jovens e velhos produzidos durante a conidiogênese, apresentam diferenças na termotolerância em base à hidrofobia. Os conídios mais velhos apresentam maior hidrofobicidade e conseqüentemente, mais termotolerância do que os conídios jovens que são menos hidrofóbicos e menos termotolerantes.

As condições nutricionais em que os fungos entomopatogênicos são cultivados também podem interferir na termotolerância dos conídios (RANGEL et al., 2005; ALI et al., 2011). Rangel et al. (2005) também observaram que conídios secos do fungo *M. anisopliae* foram mais tolerantes à temperatura seca de 50°C, do que 45°C em suspensão aquosa.

Segundo Rangel et al. (2008), observaram uma notável variabilidade na termotolerância em conídios de *M. anisopliae*. Aqueles produzidos sob estresse nutritivo eram duas vezes mais tolerantes ao calor e UV-B do que conídios produzidos em meios ricos em nutrientes. Além disto, conídios produzidos sob choque térmico e osmótico (sódico ou potássico) apresentaram maior tolerância à radiação UV-B e calor do que conídios produzidos sem essas condições. Kim, Je e Roh (2010) relataram que uma mistura de óleo de grão de milho como fonte de ácidos graxos insaturados melhorou a termotolerância de conídios do fungo *I. fumosorosea*.

De forma semelhante, Ali et al. (2011) relataram que os conídios do fungo *I. fumosorosea* produzidos em meio de cultura Sabouraud dextrose Ágar (SDA) suplementado com sulfato de cobre e sulfato de zinco foram 2,66 vezes mais termotolerantes do que os conídios produzidos em meios SDA.

2.5 Considerações Finais

Pelos resultados apresentados neste capítulo pode se concluir que, para selecionar um isolado fúngico é preciso confrontar os dados de produtividade de conídios em substratos sólidos, tolerância à radiação UV-B e temperatura elevada (45°C) para a escolha do melhor isolado de *I. fumosorosea* para ser utilizado no controle microbiano de pragas. Os isolados

ESALQ-4556 e ESALQ-4778 apresentaram maior produtividade de conídios em grão de arroz, mas não apresentaram vantagens quando a tolerância à radiação UV-B e temperatura. Portanto, a produção de conídios do isolado ESALQ-1296 não diferiu da maioria dos isolados, mas foi inferior a ESALQ 4556 e ESALQ-4778. Entretanto, este isolado apresentou elevada tolerância à radiação UV-B e temperatura elevada o qual poderia ser importante para sua eficiência no controle de pragas e persistência no ambiente. Esses três isolados devem ser confrontados em bioensaios em condições de campo para decisão daquele com maior potencial para o desenvolvimento de um biopesticida.

Referências

- ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; CRUZ, R.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e função do período e condições de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 57-63, 1983.
- ALI, S.; WANG, Z.Q.; REN, S.X.; HUANG, Z. Superoxide dismutase production by *Isaria fumosorosea* on metals and its role in stress tolerance and fungal virulence. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 21, p. 1457–1469, 2011.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba. FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-370.
- ALVES, S.B.; LEUCONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. cap. 5, p. 97-169.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. **Ecossistema**, Espírito Santo Do Pinhal, v. 14, p. 188-192, 1986.
- ALVES, S.B.; MOINO JR.A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. cap. 8, p. 217-238.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637-710.
- BATISTA FILHO, A.; CARDELLI, M.A. Viabilidade dos esporos de *B. bassiana* (Bals.) Vuill., isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. **Biológico**, São Paulo, v. 52, p. 57-59, 1986.
- BENZ, G. Environment. In: FUXA, R.; TANADA, Y. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. p. 177-214.

- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, M.T.; DEKONING, J.; DE CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species?. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1335–1342, 2001.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 78, p. 98–108, 2001.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, C.D.; FREIMOSER, F.; LEGER, R.J.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage to fungi from solar-UV exposure, and genetic and molecular-biology approaches to mitigation. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 2002, Londrina. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 241–245.
- CABANILLAS, H.E.; DE LEÓN, J.H.; HUMBER, R.A.; MURRAY, K.D.; JONES, W.A. *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. **Mycoscience**, Tokyo, v. 54, p. 158–169, 2013.
- COSTA, L.B.; RANGEL, D.E.N.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* on strawberry leaves. **Biological Control**, Orlando, v. 65, p. 95–100, 2013.
- DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J.; MORAL, R.A. Models for overdispersed data in entomology. In: FERREIRA, C.P.; GODOY, W.A.C. (Ed.) **Ecological Modelling Applied to Entomology**, New York: Springer, 2014. chap. 9, 219–259.
- FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; SMITS, N.; COUSTERE, C.; ITIER, B. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 7078, 1997.
- FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v. 135, p.171–181, 1996.
- FARIA, M.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237–256, 2007.
- FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, p. 115–128, 2010.
- FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V R.E.P.; ROBERT, D.W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, n. 3, p. 237–243, 2007.

_____. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, p. 69–78, 2008.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRIGHT, S.P. Fungi. In: _____. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2000. chap. 4, p. 255-282.

JACKSON, C.W.; HEALE, J.B.; HALL, R.A. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 106, p. 39-48, 1985.

KIM, J.; JE, Y.; ROH, J. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, p. 419-423, 2010.

KIM, J.S.; SKINNER, M.; HATA, T.; PARKER, B.L. Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 105, p. 322–328, 2010.

KLEESPIES, R.G.; ZIMMERMANN, G. Effect of additive on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 19-309, 1994.

LI, J.; FENG, M.-G. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 93–99, 2009.

MANIANIA, N.K.; FARGUES, J. Susceptibility of *Mamestra brassicae* (L.), and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lep. Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brown and Smith) and *Nomuraea rileyi* (Samson) at two temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 113, n. 5, p. 518-524, 1992.

MASCARIN, G.M.; QUINTELA, E.D. **Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 12 p. (Documentos, 21).

MASCARIN, G.M.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p. 753–761. 2010.

MOINO JUNIOR, A. **Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., para o controle de pragas de grãos armazenados**. 1993. 100 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

MURILLO-ALONSO, K.T.; PEÑA-CHORAB, G.; HERNÁNDEZ-BALTAZAR, E.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V.M. Conidia production by *Isaria fumosorosea* on solid substrates and its pathogenicity towards *Bemisia tabaci*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 175-184, 2015.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models, **Journal of the Royal Statistical Society**. Series A (General), London, v. 135, p. 370-384, 1972.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 3, p. 657-672, 1990.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, p. 116–125, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 03 dez. 2014.

SILVA, E.A.R.; BATISTA FILHO, A.; WENZEL, I.M.; FURTADO, E.L.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 549-556, 2012.

SOUZA, R.K.F.; AZEVEDO, R.F.F.; LOBO, A.O.; RANGEL, D.E.N. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi, **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 448-461, 2014.

TANZINI, M.R. **Controle de percevejo de renda da seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos**. 2002. 140 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of Some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 147–152, 1996.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L.A. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 70, p. 18–26, 1997.

XIE, M.; WANG, L.; LU, L.; ZHAO, R.; HE, Y. Characterisation of *Isaria fumosorosea* isolates and their virulence toward the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 1167–1182, 2014.

YING, S.H.; FENG, M.G. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 323–331, 2004.

3 PERSISTÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Isaria fumosorosea* EM FORMULAÇÕES DO TIPO DISPERSÃO OLEOSA

Resumo

O sucesso dos produtos à base de agentes de controle microbiano está relacionado à viabilidade por longos períodos em condições não controladas. Este trabalho teve por objetivo ajustar o ponto de secagem dos conídios de *Isaria fumosorosea* para incrementar o tempo de prateleira e determinar a persistência dos conídios em formulações do tipo dispersão oleosa. Foram utilizados conídios do isolado ESALQ-1296 produzidos em arroz sem secar com atividade de água (a_w) de 0,527 e conídios secos com a_w de 0,410; 0,248 e 0,182 adicionados ao adjuvante KBRAdj puro. A sobrevivência dos conídios mais secos foi maior do que a de conídios mais úmidos. O adjuvante promoveu proteção aos conídios sem secar, apresentando viabilidades significativamente maiores do que conídios sem secar sem adjuvante em todos os períodos de armazenamento. Conídios com $a_w = 0,182$ sem adjuvante apresentaram as maiores viabilidades (70,3%) após 60 dias de armazenamento. Para desenvolver uma formulação do tipo dispersão oleosa foram testadas misturas de 25% de óleo de soja ou canola + 75% do adjuvante KBRAdj com ou sem sílica gel, em conídios úmidos ($a_w = 0,546$ e UR = 13,18%) ou secos ($a_w = 0,175$ e UR = 4,42%). A adição de 25% de óleo vegetal ou sílica gel na formulação não contribuiu para o incremento do período de prateleira da formulação. A viabilidade dos conídios nas diferentes formulações após 90 dias de armazenamento variou de $42,3 \pm 0,03\%$ a $56,9 \pm 0,01\%$. Novos adjuvantes e óleos vegetais que proporcionem uma maior estabilidade no armazenamento e desempenho em condições de campo devem ser investigados.

Palavras-chave: *Isaria fumosorosea*; Conídios; Sílica gel; Formulação oleosa; Tempo de prateleira

Abstract

The success of microbial control products is related to their viability for extended periods in uncontrolled conditions. This study aimed to adjust the drying point of the *Isaria fumosorosea* conidia to increase the shelf-life and to determine the persistence of conidia on the oil dispersion formulations. Conidia from the isolate ESALQ-1296 grown on rice without drying with water activity (a_w) = 0.527 and dried conidia with a_w of 0.410; 0.248 and 0.182 added to pure KBRAdj adjuvant were used. Survival of the dry conidia was higher than humid conidia. The adjuvant provided protection to conidia without drying, with significantly higher viability than conidia without drying and without adjuvant at all storage periods. Conidia with $a_w = 0.182$ without adjuvant showed the highest viability (70.3%) after 60 days of storage. To develop a formulation of the oil dispersion type, mixtures of 25% of soy or canola oil + 75% of KBRAdj adjuvant with or without silica gel in humid ($a_w = 0.546$ and RH = 13.18%) or dried conidia ($a_w = 0.175$ and RH = 4.42%) were tested. Addition of 25% of vegetable oil or silica gel in the formulation did not contribute to the increase of the formulation shelf-life. The viability of the conidia in various formulations after 90 days of storage ranged from $42.3\% \pm 0.03\%$ to $56.9 \pm 0.01\%$. Further studies with other adjuvants and vegetable oils to increased storage stability and performance under field conditions must be pursued.

Keywords: *Isaria fumosorosea*; Conidia; Silica gel; Oil formulation; Shelf life

3.1 Introdução

Fungos entomopatogênicos apresentam grande potencial como agentes de controle microbiano, porém, poucas espécies têm sido produzidas e utilizadas em escala comercial (LACEY; GOETTEL, 1995). Os fungos entomopatogênicos mais utilizados para o controle de pragas são *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo poucos produtos a base de *I. fumosorosea* registrados no mundo (ALVES et al., 2008; FARIA; WRAIGHT, 2007).

O fungo *I. fumosorosea* é comercializado para o controle da mosca-branca, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) (BOLCKMANS et al., 1995; OSBORNE; LANDA, 1994), e para *Bemisia tabaci* biótipo B em alguns países (LACEY; FRANSEN; CARRUTHERS, 1996), mas não existem produtos comerciais com esse fungo no Brasil.

A viabilidade e vigor dos propágulos infectivos dos fungos entomopatogênicos durante o armazenamento são fatores importantes para uma boa qualidade dos micoinsecticidas. No entanto, a manutenção da viabilidade durante o armazenamento, referido como período de prateleira, é um dos desafios nas formulações de fungos entomopatogênicos. Vários estudos sobre o armazenamento de fungos entomopatogênicos concentraram-se na influência da temperatura sobre a viabilidade dos conídios formulados (MARQUES; ALVES; MARQUES, 1999; PEREIRA; ROBERTS, 1991; SMITH et al., 1999) e o conteúdo de umidade dos conídios para prolongar a vida de prateleira (HEDGECKOCK et al., 1995; MOORE et al., 1996; HONG; ELLIS; MOORE, 1997; SANYANG; VAN EMDEN; MOORE, 2000).

O tipo de formulação está intimamente relacionado à vida útil de prateleira, persistência no ambiente após a aplicação (HONG et al., 2005; WRAIGHT; JACKSON; DEKOCK, 2001; FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994) e desempenho sob condições ambientais adversas e conseqüentemente sua aceitação por parte dos produtores (LACEY et al., 2001). Poucas formulações do tipo dispersão oleosa (DO) de micopesticidas existem no mundo, especialmente pela carência de informações sobre os parâmetros para incrementar o período de prateleira desse tipo de formulação. Diversos trabalhos demonstraram que as formulações em óleo emulsionável permitem uma maior tolerância do fungo aos efeitos negativos do ambiente, tais como temperatura elevada, radiação ultravioleta e dessecação (DAOUST; WARD; ROBERTS, 1983; STARTHES et al., 1993). Estudos conduzidos por McCLATCHIE et al. (1994) demonstraram que conídios de *M. flavoviride* formulado com óleo vegetal resultou em maior tolerância a temperaturas altas.

Formulações feitas à base de óleo também tem a vantagem de misturar melhor com os conídios lipofílicos (STATHERS; MOORE; PRIOR, 1993) facilitar a aplicação por pulverização em ultra-baixo volume (UBV) (BATEMAN; ALVES, 2000) e aumentar a sua infectividade em comparação com outras formulações (AGUDELO; FALCON, 1983; PRIOR et al., 1988; BATEMAN et al., 1993).

Dessa forma, é necessária a realização de trabalhos que ajudem no entendimento da manutenção da viabilidade de conídios por longos períodos de armazenamento. Este trabalho teve como objetivo ajustar o ponto de secagem de conídios de *I. fumosorosea* para incrementar o tempo de prateleira em formulações dispersão oleosa (DO).

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba, SP.

3.2.1 Extração e secagem dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296

O tempo de secagem dos conídios foi avaliado com o objetivo de determinar a melhor umidade para armazenamento. Para isso, o isolado ESALQ-1296 foi produzido em sacos plásticos de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.3, onde em cada peneira colocaram aproximadamente 200 g de arroz com fungo. A extração de conídios foi feita em sistema de peneiras com agitação constante (Agitador de peneiras tipo magnético marca Bertel) por 30 minutos e o pó de conídios foi coletado nos recipientes que ficam abaixo de cada peneira (Figura 11).

O pó de conídios obtido foi colocado em recipientes de vidro de 500 mL com tampa plástica contendo 300 g de sílica gel e aproximadamente 2 g de pó de conídios (Figura 12). Os recipientes foram mantidos em sala climatizada a 18°C durante 4, 8, 24, 48 e 72 horas para favorecer a secagem dos conídios e a obtenção de amostras com diferentes conteúdos de água. No tratamento testemunha 2 g de conídios foram colocados nos recipientes de vidro sem sílica gel (tempo zero).

Figura 3.1 - Sistema de peneiras utilizado para a extração de conídios de *I. fumosorosea* após produção em arroz

Figura 3.2 - A. Cápsulas de medição de atividade de água (a_w) com pó de conídios. B. Frascos de vidro com sílica gel. C. Frascos fechados com a sílica gel e conídios

A atividade de água (a_w) dos conídios foi medida no aparelho LabMaster-aw (Novasina[®]) e a umidade relativa determinada na balança da marca SHIMADZU de acordo com o protocolo do comerciante. As amostras com diferentes umidades foram acondicionadas em tubos tipo Falcon e embaladas a vácuo com o intuito de evitar a entrada de ar úmido.

3.2.2 Relação entre a umidade dos conídios de *I. fumosorosea* e a sobrevivência

Os conídios obtidos após a secagem em sílica gel foram misturados com o adjuvante KBRAdj puro para desenvolver uma formulação do tipo dispersão oleosa (DO). Estudos prévios conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos

demonstraram que o Adjuvante KBRA_{adj} é compatível com os conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (CONCESCHI, 2013; AUSIQUE, 2014). Conídios puros (0,05 g) de *I. fumosorosea* de cada tempo de secagem (4,8 e 48 horas) foram misturados com 20 mL de KBRA_{adj} puro na concentração de 1×10^8 conídios/mL. Como controle, foram utilizados conídios com diferentes níveis de atividade de água (a_w) sem o adjuvante. O experimento consistiu dos seguintes tratamentos:

T1: conídios sem secar ($a_w = 0,527$)

T2: conídios sem secar ($a_w = 0,527$) + KBRA_{adj}

T3: conídios secos por 4 horas ($a_w = 0,410$)

T4: conídios secos por 4 horas ($a_w = 0,410$) + KBRA_{adj}

T5: conídios secos por 8 horas ($a_w = 0,248$)

T6: conídios secos por 8 horas ($a_w = 0,248$) + KBRA_{adj}

T7: conídios secos por 48 horas ($a_w = 0,182$)

T8: conídios secos por 48 horas ($a_w = 0,182$) + KBRA_{adj}

Os conídios secos com e sem adjuvante foram colocados em tubos Eppendorf de 1,5 mL e armazenados numa câmara climatizada do tipo B.O.D. ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) com 12 horas de fotofase por 75 dias. A germinação dos conídios foi avaliada a cada 15 dias utilizando o método de contagem direta. Nesse método, a concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ foi ajustada em todos os tratamentos e, posteriormente, 150 µL da suspensão foi inoculada no centro de placas do tipo “Rodac” contendo 5 mL do meio de cultura BDA Difco® mais o fungistático Derosal 1 mL/L e o Pentabiótico 5 mg/mL. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com 12 horas de fotofase por 24 horas. A porcentagem de germinação foi avaliada em microscópio óptico com aumento de 400x. Cada tratamento consistiu de três repetições por tempo de armazenamento sendo que, cada repetição consistiu de duas placas “Rodac” para a medição da germinação dos conídios. Este experimento foi repetido três vezes no tempo, mas somente são apresentados os resultados do último experimento.

3.2.3 Sobrevivência de conídios de *I. fumosorosea* em formulações do tipo dispersão oleosa

Para desenvolver uma formulação do tipo dispersão oleosa (DO) foram testadas diferentes misturas do adjuvante KBRA_{adj} (em fase de registro) em óleo de soja e canola com os conídios de *I. fumosorosea* do isolado ESALQ-1296.

Os conídios utilizados foram obtidos por fermentação em arroz e extração pelo sistema de peneiras (item 3.2.1). O pó de conídio foi separado em duas partes, sendo uma armazenada em freezer (sem secar) e a outra parte colocada em frascos de vidro com sílica gel para secagem dos conídios por 72 horas (item 3.2.1). A atividade de água dos conídios foi medida no aparelho LabMaster-aw (Novasina®) obtendo um valor inicial de $a_w=0,546$ para os conídios sem secar e de $a_w=0,175$ para os conídios secos em sílica gel após 72 horas.

Posteriormente, os conídios com diferentes a_w foram pesados para ajustar a concentração de $2,5 \times 10^9$ conídios/mL misturados com os óleos vegetais (óleo comercial de soja e canola marca “Liza”) e o adjuvante KBRAdj. O volume utilizado para as formulações foi de 25% dos óleos vegetais e 75% do adjuvante KBRAdj. Em alguns tratamentos foi adicionada sílica gel (1/3 do volume do frasco de vidro de 2 mL) para reduzir a umidade da formulação. O experimento consistiu dos seguintes tratamentos:

T1: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios sem secar ($a_w=0,546$; UR= 13,18%).

T2: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios sem secar ($a_w=0,546$; UR= 13,18%) + com sílica gel.

T3: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios secos ($a_w=0,175$; UR= 4,42%).

T4: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios secos ($a_w=0,175$; UR= 4,42%) + com sílica gel.

T5: 75% KBRAdj + 25% óleo de canola + conídios sem secar ($a_w=0,546$; UR= 13,18%).

T6: 75% KBRAdj + 25% óleo de canola + conídios secos ($a_w=0,175$; UR= 4,42%).

T7: 100% KBRAdj + conídios sem secar ($a_w=0,546$; UR= 13,18%).

T8: 100% KBRAdj + conídios sem secar ($a_w=0,546$; UR= 13,18%) + com sílica gel.

T9: 100% KBRAdj + conídios secos ($a_w=0,175$; UR= 4,42%).

T10: 100% KBRAdj + conídios secos ($a_w=0,175$; UR= 4,42%) + com sílica gel.

T11: conídios sem secar ($a_w=0,546$; UR= 13,18%).

T12: conídios secos ($a_w=0,175$; UR= 4,42%).

Todos os tratamentos foram colocados em frascos de vidro de 2 mL com tampa rosca plástica e armazenados numa câmara climatizada do tipo B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com 12 horas de fotofase por 90 dias. A germinação dos conídios foi avaliada com uma frequência de 30 dias pelo método de contagem direta, conforme mencionado no item 3.2.2.

3.2.4 Análises estatísticas

Os dados de porcentagem de germinação obtidos nos testes de prateleira e nas formulações foram transformados para arcosseno ($\sqrt{x}/100$). As diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste de ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram conduzidas no programa SAS versão 9.3 (2002-2010).

3.3 Resultados

3.3.1 Relação entre o teor de umidade e a sobrevivência de conídios de *I. fumosorosea*

Ao longo do tempo de armazenamento com a sílica gel foi observada uma redução rápida na umidade dos conídios nas oito primeiras horas de secagem e poucas diferenças entre 24 h e 72 h. Atividade de água (a_w) inicial dos conídios usados no segundo experimento era de $a_w = 0,546$ e após 72 horas passou para $a_w = 0,175$. A umidade relativa inicial dos conídios era de 13,18% e após 72 horas de secagem em sílica gel, atingiu 4,42%.

Pode-se observar que a redução na viabilidade de conídios nos primeiros 15 dias foi pequena em quase todos os tratamentos (Tabela 6). Após 30 dias, a redução no tratamento onde os conídios foram armazenados sem secar e sem o adjuvante foi maior do todos os outros tratamentos observados ($F_{(7,40)} = 35,23$; $P < 0.0001$) tendo passado de 97,1% para 46,6%. O adjuvante promoveu proteção aos conídios sem secar, propiciando viabilidades significativamente maiores do que conídios sem secar sem adjuvante em todos os períodos de armazenamento. Analisando a interação entre a umidade dos conídios e sobrevivência, observa-se que a viabilidade dos conídios mais secos foi maior do que de conídios mais úmidos. Entretanto, a porcentagem de germinação dos conídios secos sem adjuvante foram significativamente maiores ($F_{(7,40)} = 284,46$; $P < 0.0001$) que os conídios formulados com KBRAdj armazenados por 45 dias, exceto para aqueles com atividade de água $a_w = 0,410$. Conídios com $a_w = 0,182$ sem adjuvante apresentaram maiores sobrevivências ($F_{(7,40)} = 62,36$; $P < 0.0001$) entre todos os tratamentos testados após 60 dias de armazenamento, mantendo viabilidade de 70,32%. Após 75 dias, todos os tratamentos apresentavam germinação inferior a 20%.

Tabela 3.1 - Média e erro padrão (EPM) da porcentagem de germinação de conídios de *I. fumosorosea* durante o armazenamento em câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com 12 horas de fotoperíodo

Tratamentos	Germinação de conídios (%) $\pm$ (EPM)*.					
	Início	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
T1: conídios sem secar ($a_w = 0,527$)	$97,12 \pm 0,010^{\text{Aa}}$	$82,57 \pm 0,018^{\text{CDb}}$	$46,56 \pm 0,026^{\text{Cc}}$	$4,14 \pm 0,006^{\text{Dd}}$	$1,70 \pm 0,004^{\text{Ee}}$	-
T2: conídios sem secar ($a_w = 0,527$) + KBRAdj	$92,42 \pm 0,042^{\text{Aa}}$	$86,41 \pm 0,016^{\text{BCa}}$	$71,76 \pm 0,022^{\text{Ba}}$	$39,10 \pm 0,029^{\text{Cb}}$	$9,89 \pm 0,023^{\text{Dc}}$	$3,22 \pm 0,008^{\text{Cd}}$
T3: conídios secos por 8 horas ($a_w = 0,410$)	$97,32 \pm 0,015^{\text{Aa}}$	$91,76 \pm 0,011^{\text{ABa}}$	$73,68 \pm 0,020^{\text{Bb}}$	$54,21 \pm 0,023^{\text{Bc}}$	$22,36 \pm 0,012^{\text{Cd}}$	$1,72 \pm 0,002^{\text{Ce}}$
T4: conídios secos por 8 horas ($a_w = 0,410$) + KBRAdj	$93,66 \pm 0,023^{\text{Aa}}$	$85,24 \pm 0,022^{\text{BCba}}$	$71,03 \pm 0,019^{\text{Bb}}$	$49,69 \pm 0,008^{\text{Bc}}$	$21,94 \pm 0,028^{\text{Cd}}$	$12,38 \pm 0,016^{\text{ABe}}$
T5: conídios secos por 24 horas ($a_w = 0,248$)	$97,20 \pm 0,010^{\text{Aa}}$	$95,26 \pm 0,013^{\text{Aa}}$	$88,56 \pm 0,016^{\text{Aba}}$	$81,15 \pm 0,022^{\text{Ab}}$	$39,13 \pm 0,043^{\text{Bc}}$	$17,32 \pm 0,007^{\text{Ad}}$
T6: conídios secos por 24 horas ($a_w = 0,248$) + KBRAdj	$90,51 \pm 0,023^{\text{Aa}}$	$78,46 \pm 0,010^{\text{Db}}$	$77,88 \pm 0,020^{\text{ABb}}$	$55,08 \pm 0,011^{\text{Bc}}$	$28,97 \pm 0,014^{\text{BCd}}$	$13,41 \pm 0,009^{\text{ABe}}$
T7: conídios secos por 48 horas ($a_w = 0,182$)	$94,85 \pm 0,012^{\text{Aa}}$	$95,89 \pm 0,011^{\text{Aa}}$	$87,32 \pm 0,023^{\text{Aa}}$	$86,29 \pm 0,018^{\text{Aa}}$	$70,32 \pm 0,020^{\text{Ab}}$	$10,66 \pm 0,015^{\text{Bc}}$
T8: conídios secos por 48 horas ($a_w = 0,182$) + KBRAdj	$88,97 \pm 0,032^{\text{Aa}}$	$85,98 \pm 0,013^{\text{BCa}}$	$80,26 \pm 0,032^{\text{ABa}}$	$56,33 \pm 0,012^{\text{Bb}}$	$28,79 \pm 0,016^{\text{BCc}}$	$10,78 \pm 0,017^{\text{Bd}}$
$^{\circ}\text{CV}(\%)$:	1,97	2,09	3,91	4,68	13,57	15,33

*Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas mesmas colunas e minúsculas nas mesmas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 0,05$. CV = coeficiente de variação médio entre os tratamentos

3.3.2 Sobrevivência de conídios de *I. fumosorosea* em formulações do tipo dispersão oleosa

Foram testadas 10 misturas de óleos vegetais (soja e canola) com o adjuvante KBRA_{adj}, objetivando-se desenvolver uma formulação capaz de proteger os conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 de condições adversas no campo e mantê-lo viável durante o armazenamento.

Quando os conídios de *I. fumosorosea* formulados foram armazenados em câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase, observaram diferenças significativas na porcentagem de germinação em todos os tratamentos (Tabela 10). Os conídios puros sem secar $a_w=0,546$ e conídios puros secos $a_w=0,175$ (controles), após 30 dias de armazenamento, apresentaram uma redução significativa na viabilidade ($F_{(11,60)}=21,53$; $P < 0.0001$) em comparação aos tratamentos contendo óleos vegetais e KBRA_{adj}, sendo observado que essa redução foi independentemente das atividades de água (a_w) dos conídios. Após 60 dias esses tratamentos não formulados não estavam mais viáveis ($<0,5\%$ germinação).

Após 60 dias de armazenamento, as maiores porcentagens de germinação foram observadas nos tratamentos com conídios sem secar + óleo de soja + KBRA_{adj}, conídios secos + óleo de soja + KBRA_{adj}, conídios sem secar em 100% KBRA_{adj} e conídios secos em 100% KBRA_{adj}, ($F_{(11,60)}=12,24$; $P < 0.0001$). Portanto, aos 90 dias de armazenamento o tratamento com conídios sem secar + KBRA_{adj} com o valor de germinação de 56,9% ($F_{(9,50)}=2,58$; $P=0,0161$), não diferiu da maioria dos tratamentos.

A adição de 25% de óleo vegetal na formulação não afetou a sobrevivência dos conídios. A adição de sílica gel nas formulações teve por objetivo reduzir o conteúdo de água e, consequentemente, aumentar a estabilidade dos conídios nas formulações. Porém, nossos resultados indicam que a adição deste dessecante diminuiu a germinação dos conídios em todas as comparações com tratamentos sem sílica gel aos 60 dias de armazenamento.

A viabilidade após 90 dias variou entre $42,3 \pm 0,03\%$ e $56,9 \pm 0,01\%$ nos tratamentos formulados, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos.

Ao comparar os resultados deste experimento com o experimento anterior onde foram misturados os conídios com diferentes níveis de atividade de água ao adjuvante KBRA_{adj} percebe-se que mesmo tendo a germinação inicial sido menor no segundo experimento o tempo de prateleira foi maior. A hipótese mais provável é de que isso esteja associado ao tipo de recipiente usado já que no experimento anterior foram utilizados tubos ependorf de 1,5 mL e neste experimento tubos de vidro de 2 mL para armazenamento. Os tubos de plástico devem permitir trocas de umidade e oxigênio com o ambiente. Entretanto, isto precisa ser repetido para incrementar o período de armazenamento. Segundo Hedgecock et al. (1995), o ganho de

água durante o armazenamento dos conídios pode interferir negativamente na viabilidade. Em geral, a temperatura, umidade dos conídios e umidade do ambiente de armazenamento, são os principais fatores que influenciam a longevidade de conídios (HONG; ELLIS; MOORE, 1997).

Tabela 3.2 - Média e erro padrão (EPM) da porcentagem de germinação de conídios de *I. fumosorosea* durante o armazenamento em câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com 12 horas de fotoperíodo

Tratamentos	Germinação de conídios (%) $\pm$ (EPM)*			
	Inicial#	30 dias	60 dias	90 dias
T1: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios sem secar ($a_w=0,546$)	$79,17 \pm 0,016^{\text{Ba}}$	$73,50 \pm 0,007^{\text{ABab}}$	$70,10 \pm 0,011^{\text{Ab}}$	$47,41 \pm 0,027^{\text{ABc}}$
T2: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios sem secar ($a_w=0,546$) + com sílica gel	$79,64 \pm 0,018^{\text{ABa}}$	$71,05 \pm 0,009^{\text{ABb}}$	$60,38 \pm 0,015^{\text{Bc}}$	$52,84 \pm 0,011^{\text{ABd}}$
T3: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios secos ($a_w=0,175$)	$83,23 \pm 0,020^{\text{ABa}}$	$68,04 \pm 0,014^{\text{Bb}}$	$71,16 \pm 0,011^{\text{Ab}}$	$50,15 \pm 0,029^{\text{ABc}}$
T4: 75% KBRAdj + 25% óleo de soja + conídios secos ($a_w=0,175$) + com sílica gel	$83,07 \pm 0,006^{\text{ABa}}$	$73,18 \pm 0,017^{\text{ABa}}$	$60,95 \pm 0,010^{\text{Bb}}$	$50,47 \pm 0,020^{\text{ABc}}$
T5: 75% KBRAdj + 25% óleo de canola + conídios sem secar ($a_w=0,546$)	$81,08 \pm 0,017^{\text{ABa}}$	$71,30 \pm 0,019^{\text{ABab}}$	$65,42 \pm 0,024^{\text{ABb}}$	$49,08 \pm 0,016^{\text{ABc}}$
T6: 75% KBRAdj + 25% óleo de canola + conídios secos ($a_w=0,175$)	$75,88 \pm 0,017^{\text{Ba}}$	$73,60 \pm 0,018^{\text{ABa}}$	$61,32 \pm 0,015^{\text{Bb}}$	$47,40 \pm 0,023^{\text{ABc}}$
T7: 100% KBRAdj + conídios sem secar ($a_w=0,546$)	$83,98 \pm 0,008^{\text{ABa}}$	$72,72 \pm 0,017^{\text{ABb}}$	$71,01 \pm 0,009^{\text{Ab}}$	$56,89 \pm 0,006^{\text{Ac}}$
T8: 100% KBRAdj + conídios sem secar ($a_w=0,546$) + com sílica gel	$79,34 \pm 0,017^{\text{ABa}}$	$76,79 \pm 0,010^{\text{Aa}}$	$60,22 \pm 0,016^{\text{Bb}}$	$42,33 \pm 0,032^{\text{Bc}}$
T9: 100% KBRAdj + conídios secos ($a_w=0,175$)	$85,78 \pm 0,015^{\text{ABa}}$	$74,69 \pm 0,022^{\text{ABa}}$	$71,33 \pm 0,016^{\text{Ab}}$	$48,35 \pm 0,035^{\text{ABc}}$
T10: 100% KBRAdj + conídios secos ($a_w=0,175$) + com sílica gel	$84,90 \pm 0,017^{\text{ABa}}$	$73,89 \pm 0,011^{\text{ABb}}$	$59,65 \pm 0,014^{\text{Bc}}$	$50,32 \pm 0,019^{\text{ABd}}$
T11: conídios sem secar ($a_w=0,546$)	$89,24 \pm 0,008^{\text{Aa}}$	$50,21 \pm 0,022^{\text{Db}}$	$0,49 \pm 0,001^{\text{Cc}}$	-
T12: conídios secos ($a_w=0,175$)	$88,74 \pm 0,016^{\text{Aa}}$	$58,75 \pm 0,025^{\text{Cb}}$	$0,46 \pm 0,001^{\text{Cc}}$	-
$^{\circ}\text{CV}$ (%)	2,22	3,09	2,79	6,00

*Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 0,05$.

$^{\circ}\text{CV}$ = coeficiente de variação médio entre os tratamentos; #viabilidade imediatamente após a mistura dos conídios com os componentes da formulação

3.4 Discussão

Segundo Hong et al. (2005); Horaczek e Viernstein (2004) a secagem dos conídios é uma das principais etapas durante o processo de produção de conídios para permitir o armazenamento dos fungos entomopatogênicos sem perda na viabilidade. A chave para prolongar a sobrevivência dos conídios é deter a germinação e reduzir o metabolismo ao máximo através da desidratação. Luz e Fargues (1997) e Andersen et al. (2006), ao estudarem a germinação de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, observaram que os tempos de germinação aumentaram à medida que a atividade de água diminuiu. Portanto, o benefício da secagem de conídios é a redução da sua atividade metabólica, o qual minimiza a perda das reservas de alimento e a produção de metabólitos tóxicos (GUIJARRO et al, 2006).

O uso de sílica gel para a secagem de conídios de fungos entomopatogênicos foi reportada como eficiente devido ao fato de que os cristais de sílica gel absorvem as moléculas de água do ar e melhoram a estabilidade dos fungos durante seu armazenamento (ALVES; FARIA, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Moore et al. (1996), os quais relataram que, após de 98 dias de armazenamento, a temperaturas de 28-32°C, os conídios pré-secos com sílica gel apresentaram maior viabilidade (76%) do que os conídios sem secar em sílica gel. Verificou-se que, conídios secados com sílica gel e armazenados em óleos foram beneficiados com a adição de sílica gel às suspensões, alcançando a viabilidade de 79,8% após de 105 dias de armazenamento em temperaturas de 28-32°C. Da mesma forma, Magalhães e Boucias (2004) relataram que a pré-secagem de conídios de *M. acridum* em câmara de secagem apresentou maior viabilidade do que conídios sem secar. McClatchie et al. (1994) estudando a secagem de conídios de *M. flavoviride* com sílica gel, encontraram que os conídios aumentaram sua tolerância a altas temperaturas. Entretanto, Hedgecock et al. (1995) estudaram a influência da umidade sobre a tolerância à temperatura de *M. anisopliae* em armazenamento com formulação de óleo e os resultados demonstraram que a viabilidade diminuiu devido às altas temperaturas e elevadas umidades. A máxima estabilidade dos fungos entomopatogênicos foi observada quando a umidade relativa dos conídios foi inferior a 5% durante o armazenamento (MOORE et al., 1996; HEDGECKOCK et al., 1995; HONG et al., 2001).

Como foi descrito previamente, os conídios dos fungos entomopatogênicos com elevado conteúdo de água não toleram armazenamento por longos períodos de tempo. Marques e Alves (1996) demonstraram que a viabilidade de conídios com teor de umidade de 15,5% foi reduzida em menos de 30 dias de armazenamento a 30°C. Na presente pesquisa, os conídios

de *I. fumosorosea* sem secar apresentaram $a_w = 0,527$ e 13,18% de umidade relativa e também apresentaram sobrevivência curta.

Diversos trabalhos demonstraram que valores de umidade inferior a 5% aumenta a longevidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos durante o armazenamento (HEDGECK et al., 1995; MOORE et al., 1996; HONG et al., 2001). Nossos resultados demonstraram que os conídios de *I. fumosorosea* com $a_w = 0,182$ e aproximadamente 5% de umidade relativa apresentaram os melhores resultados após 60 dias de armazenamento a 26°C.

A escolha dos adjuvantes para o desenvolvimento de uma formulação é uma etapa crítica porque é necessário testar a compatibilidade entre os adjuvantes e os conídios. Entretanto, a maioria dos testes de compatibilidade é realizada no máximo em 24 horas de contato, sendo o ideal que se estude o efeito dos adjuvantes isoladamente em diferentes tempos e temperaturas de armazenamento. Em nosso trabalho, todos os tratamentos com o adjuvante KBRA_{adj} puro apresentaram resultados satisfatórios por 30 dias com 80,26% de viabilidade. Entretanto, a adição do adjuvante reduziu a viabilidade dos conídios em comparação com os conídios secos sem formular. Isso pode estar associado ao dano de embebição dos conídios secos ao serem colocados no adjuvante. Essa absorção rápida de água (embebição) pode causar danos graves na membrana plástica do fungo, afetando sua viabilidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Moore, Langewald e Obognon (1997), ao verificarem que conídios secos de *M. anisopliae* são propensos aos danos, mediante exposição direta à água. Entretanto Hong, Jenkins e Ellis (2000) demonstraram que a dessecação lenta melhorou a sobrevivência de *M. flavoviride*, o que implicava que a taxa de secagem influenciou a viabilidade de conídios. O possível dano embebição pode ser revertido pela utilização de água normal durante a embebição dos conídios ou ser realizada uma reidratação lenta desses conídios antes de serem imersos em água (FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009). Efeitos semelhantes também foram observados por Cintra, Almeida e Batista filho (2004), que observaram a redução da viabilidade dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* misturados com adjuvantes, verificando ainda que alguns adjuvantes foram tóxicos para as duas espécies de fungos. No entanto Zimmermann (1975) relatou que a inibição do crescimento vegetativo não é necessariamente um indicador da redução da produção de conídios ou da viabilidade dos conídios.

Segundo Alves (1992) existem poucos estudos sobre o desenvolvimento de formulações a base de fungos entomopatogênicos e a maioria dos produtos existentes no mercado não apresentam validade superior a 60 dias, especialmente para formulações oleosas. Os

resultados apresentados aqui não permitiram atingir valores superiores a 60 dias de armazenamento com níveis de viabilidades aceitáveis. Jenkins e Grzyawcz (2000) relataram que um bom micoinseticida deve apresentar uma germinação superior a 85%. Nossos resultados demonstraram que, as misturas do adjuvante KBRA_{adj} com óleos vegetais (soja e canola) podem ser armazenadas à temperatura ambiente de 26°C ± 1°C por um período de 30 dias obtendo porcentagens de germinação de 71,05% a 73,6%. A mistura contendo apenas adjuvante KBRA_{adj}, resultou em viabilidade de 56,8% após 90 dias de armazenamento a temperatura ambiente de 26°C ± 1°C. Esses resultados encontrados são semelhantes aos encontrados por Daoust, Ward e Roberts (1983) que desenvolveram formulações de *M. anisopliae* em óleos e verificaram uma redução na viabilidade dos conídios após de 60 dias de armazenamento a 19° e 26°C. Silva (2006) observou que os conídios das formulações de *B. bassiana* do tipo pó dispersível em óleo (OP) e pó molhável (PM) apresentaram uma queda de 40% na viabilidade após 30 dias de armazenamento, diferindo significativamente das formulações suspensão concentrada (SC) que perderam somente 6,4%, em relação à viabilidade inicial.

3.5 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo não permitiram grandes avanços no aumento do período de prateleira para formulações do tipo dispersão oleosa de *I. fumosorosea* em temperatura ambiente. Novos estudos com outros adjuvantes e óleos vegetais que proporcionem uma maior estabilidade no armazenamento e desempenho em condições de campo devem ser realizados. No armazenamento dessas formulações em condições refrigeradas a 4°C foi possível manter altos níveis de viabilidade mesmo após 12 meses (dados não apresentados). A potencialidade dessas formulações de *I. fumosorosea* sobre pragas de importância econômica tais como o psíldeo-dos-citros, *Diaphorina citri*, e a mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B, encontram-se em andamento.

Referências

AGUDELO, F.; FALCON, L.A. Mass production, infectivity and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 42, p. 124-132, 1983.

ALVES, R.T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2010. 50 p.

ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 77-86, 1992.

_____. Fungos entomopatogenicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-381.

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. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 3, p. 69-110.

ANDERSEN, M.; MAGAN, N.; MEAD, A.; CHANDLER, D. Development of a population-based threshold model of conidial germination for analysing the effects of physiological manipulation on the stress tolerance and infectivity of insect pathogenic fungi. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 1625-1634, 2006.

AUSIQUE, J.J.S. **Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros**. 2014. 77 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

BATEMAN, R.P.; ALVES, R.T. Delivery systems for mycoinsecticides using oil-based formulations. **Aspects of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 57, p. 163-170, 2000.

BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of applied biology**, Warwick, v. 122, p. 145-152, 1993.

BOLCKMANS, K.; STERK, G.; EYAL, J.; SELS, B.; STEPMAN, W. PreFeRal, (*Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith, strain Apopka 97), a new microbial insecticide for the biological control of whiteflies in greenhouses. **Mededelingen - Facultiet Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen**, Universiteit Gent, v. 60, p. 707-711, 1995.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Efeito de adjuvantes sobre os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, supl. 3, p. 110-112, 2003.

CONCESCHI, R.M. **Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros**. 2013. 104 p. Dissertação de (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 151-160, 1983.

FARIA, M.; HAJEK, M.A.; WRIGHT, S.P. Differential tolerance to imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Biological control**, Orlando, v. 51, p. 346-354, 2009.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237-256, 2007.

FENG, M.G.; POPARWISKI, T.J.; KHACHATOURIONS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 3-34, 1994.

GUIJARRO, B.; LARENA, I.; MELGAREJO, P.E.; DE CAL, A. Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach Brown rot disease caused by *Monilinia* spp. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, p. 257-269, 2006.

HEDGECOCK, S.; MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Influence of moisture content on tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 371-377, 1995.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H.; MOORE, D. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, p. 121-128, 1997.

HONG, T.D.; JENKINS, N.E.; ELLIS, R.H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 662-665, 2000.

HONG, T.D.; EDGINGTON, S.; ELLIS, R.H.; MURO, M.A.; MOORE, D. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 89, p. 136-143, 2005.

HONG, T.D.; GUNN, J.; ELLIS, R.H.; JENKIS, N.E.; MOORE, D. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 597-602, 2001.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 65-71, 2004.

JENKIS, N.E.; GRZYWACZ, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of products performance. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, p. 753-777, 2000.

LACEY, L.A.; FRANSEN, J.J.; CARRUTHERS, R.I. Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In: GERLING, D.; MAYER, R. **Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, and management**. Andover: Intercept, , 1996. p. 401-433.

LACEY, L.A.; GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. **Entomophaga**, Paris, v. 40, n. 1, p. 3-27, 1995.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? **Biological Control**, Orlando, v. 21, p. 230-248, 2001.

LUZ, C.; FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *B. bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 138, p. 117-125, 1997.

MAGALHÃES, B.P.; BOUEIAS, D.G. Effects of drying on the survival of conidiospores of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner. **Journal of Orthoptera Research**, Philadelphia, v. 13, p. 155-159, 2004.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B. Otimização de formulações na preservação de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 39, p. 861-877, 1996.

MARQUES, J.E.; ALVES, B.S.; MARQUES, R.M.I. Effects of the temperature and storage on formulations with mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. Bras. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 42, p. 153-160, 1999.

McCLATCHIE, G.V.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 749-756, 1994.

MOORE, D.; LANGEWALD, J.; OBOGNON, F. Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* mycopesticide formulations. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, p. 87-94, 1997.

MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O.K.; JENKINS, N.E.; LOMER, C.J. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 51-61. 1996.

OSBORNE, L.S.; LANDA, Z. Utilization of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. **IOBC-WPRS Bulletin**, Dordrecht, v. 17, p. 201-206, 1994.

PEREIRA, M.R.; ROBERTS, W.D. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of economic entomology**, Lanham, v. 84, p. 1657-1661, 1991.

PRIOR, C.P.; JOLLANDS, G.; LE, P. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 52, p. 66-72, 1988.

SANYANG, S.; VAN EMDEN, H.F.; MOORE, D. Laboratory shelf-life of oil-formulated conidia of the locust and grasshopper fungal pathogen *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal, in mixtures with the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, p. 165-168, 2000.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide; versão 9.3. Cary, 2010.

SILVA, R.Z. da. **Formulação e armazenamento de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** 2006. 87 p. Teses (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SMITH, S.M.; MOORE, D.; KARANJA, L.W.; CHANDI, E.A. Formulation of vegetable fat pellets with pheromone and *Beauveria bassiana* to control the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn). **The Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 55, p. 711-718, 1999.

STATHERS, T.E.; MOORE, D.; PRIOR, C. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, p. 111-115, 1993.

WRAIGHT, S.P.; JACKSON, M.A.; DEKOCK, S.L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents**: progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, 2001. p. 253-287.

ZIMMERMANN, G. Über die wirkung systemischer fungizide auf verschiedene insektenpathogene fungi imperfecti in vitro. **Nachrichtenbl Deutsch Pflanzeschuttdienst**, Berlin, v. 27, p. 113-117, 1975.

ANEXO

Anexo A - Identificação e procedência dos isolados do fungo *I. fumosorosea*, utilizados nos experimentos

(continua)

Cod. ESALQ	Lugar de coleta	Data da coleta	Amostra de solo/hospedeiro
ESALQ-3409	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	29/04/2013	solo de citros
ESALQ-3410	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3411	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3412	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3413	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3414	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3415	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3416	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	04/02/2014	solo de citros
ESALQ-3417	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	04/02/2014	solo de citros
ESALQ-3418	Santa Barbara D oeste, São Paulo, Brasil	04/02/2014	solo de citros
ESALQ-3692	Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil	01/08/2013	Solo Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-3419	Conchal, São Paulo, Brasil	29/04/2013	solo de citros
ESALQ-3420	Conchal, São Paulo, Brasil	29/04/2013	solo de citros
ESALQ-3421	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3422	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3423	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3424	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3425	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3426	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3427	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3428	Itirapina, São Paulo, Brasil	30/04/2013	solo de citros
ESALQ-3429	Itirapina, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3430	Itirapina, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3431	Itirapina, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3432	Itirapina, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3433	Itirapina, São Paulo, Brasil	25/06/2013	solo de citros
ESALQ-3703	Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil	01/08/2013	Rizosfera de Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-3693	Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Rizosfera de Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-3704	Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Rizosfera de Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-3701	Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Rizosfera de Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-3702	Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Rizosfera de Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-1709	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/01/2013	Solo Morangueiro (Convencional)
ESALQ-3706	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Solo Morangueiro (Convencional/Daninha)
ESALQ-3705	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/01/2013	Solo Morangueiro (Convencional/Daninha)
ESALQ-3691	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Solo Morangueiro (Orgânico)
COI 2.2 III*	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Solo Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-3698	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Solo Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-5202	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/01/2013	Solo Morangueiro (Orgânico)
ESALQ-5203-	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/01/2013	Solo Morangueiro (Orgânico)

Anexo A - Identificação e procedência dos isolados do fungo *I. fumosorosea*, utilizados nos experimentos

(continuação)

Cod. ESALQ	Lugar de coleta	Data da coleta	Amostra de solo/hospedeiro
ESALQ-3697	Cambuí, Minas Gerais, Brasil	01/04/2013	Solo Morangueiro (Orgânico/Daninha)
ESALQ-4937	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	21/03/2012	Cultivo de Palma Forrageira
ESALQ-4936	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	21/03/2012	Cultivo de Palma Forrageira
ESALQ-2023	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	21/03/2012	Cultivo de Palma Forrageira
ESALQ-1795	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	13/08/2012	Cultivo de Palma Forrageira
ESALQ-4935	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	21/03/2012	Vegetação nativa
ESALQ-4940	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	21/03/2012	Vegetação nativa
ESALQ-2674	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	23/03/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1924	Delmiro Gouveia, Alagoas, Brasil	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-4939	Rio Verde, Goiás, Brasil	27/03/2012	Cultivo de milho
ESALQ-2024	Rio Verde, Goiás, Brasil	27/03/2012	Cultivo de milho
ESALQ-4938	Rio Verde, Goiás, Brasil	27/03/2012	Cultivo de milho
ESALQ-1819	Rio Verde, Goiás, Brasil	28/03/2012	Cultivo de cana-de-açúcar
ESALQ-1296	Jaboticabal, São Paulo, Brasil	29/08/2001	mosca-branca <i>B. tabaci</i> biotipo B
ESALQ-1409	Itapetininga, São Paulo, Brasil	07/05/2008	Cultivo de pepino mosca-branca <i>Bemisia</i> sp.
ESALQ-4556	Bioma Pampa	05/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-4778	Bioma Amazônia	12/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-4798	Bioma Amazônia	12/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2728	Bioma Amazônia	12/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2729	Bioma Amazônia	12/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2730	Bioma Amazônia	12/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-1783	Bioma Amazônia	12/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2665	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2667	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2668	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2669	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2670	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-1609	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2161	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2158	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2727	Bioma Caatinga	21/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2672	Bioma Caatinga	21/03/2012	Cultivo de Palma
ESALQ-2023	Bioma Caatinga	21/03/2012	Cultivo de Palma
ESALQ-2674	Bioma Caatinga	24/03/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-2635	Bioma Mata Atlântica	14/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2024	Bioma Cerrado	28/03/2012	Cultivo de Milho
ESALQ-1819	Bioma Cerrado	28/03/2012	Cana-de-açúcar
ESALQ-2124	Bioma Cerrado	27/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2121	Bioma Cerrado	27/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-1773	Bioma Cerrado	27/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-1778	Bioma Cerrado	27/03/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2122	Bioma Cerrado	27/03/2012	Vegetação Nativa

Anexo A - Identificação e procedência dos isolados do fungo *I. fumosorosea*, utilizados nos experimentos

(continuação)

Cod. ESALQ	Lugar de coleta	Data da coleta	Amostra de solo/hospedeiro
ESALQ-2126	Bioma Cerrado	27/03/2012	Vegetação Nativa
L45.I*	Bioma Pampa	26/06/2012	Vegetação Nativa
L127.I*	Bioma Pampa	26/06/2012	Vegetação Nativa
L158.I*	Bioma Pampa	26/06/2012	Vegetação Nativa
L163.I*	Bioma Pampa	26/06/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2590	Bioma Amazônia	31/07/2012	Cultivo de Banana
ESALQ-2589	Bioma Amazônia	31/07/2012	Cultivo de Banana
ESALQ-2592	Bioma Amazônia	31/07/2012	Cultivo de Banana
ESALQ-2822	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2817	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2825	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2819	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2829	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2820	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-3016	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2821	Bioma Amazônia	07/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-2778	Bioma Amazônia	14/08/2012	Cultivo de Milho
O146.I*	Bioma Amazônia	14/08/2012	Cultivo de Milho
ESALQ-1818	Bioma Caatinga	21/08/2012	Vegetação Nativa
ESALQ-1741	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Palma
ESALQ-1998	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Palma
ESALQ-1755	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1753	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1751	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-2019	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1999	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-2018	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-2726	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1945	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1929	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-1941	Bioma Caatinga	13/08/2012	Cultivo de Feijão
ESALQ-2831	Bioma Cerrado	03/10/2012	Cana-de-açúcar
ESALQ-3316	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-4328	Bioma Caatinga	10/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3308	Bioma Mata Atlântica	06/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3307	Bioma Caatinga	09/04/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-3306	Bioma Pampa	16/04/2013	Vegetação Nativa
ESALQ 3305	Bioma Caatinga	09/04/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-3304	Bioma Caatinga	09/04/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-3303	Bioma Caatinga	09/04/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-3302	Bioma Caatinga	09/04/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-3301	Bioma Mata Atlântica	11/04/2013	Vegetação Nativa

Anexo A - Identificação e procedência dos isolados do fungo *I. fumosorosea*, utilizados nos experimentos

(continuação)

Cod. ESALQ	Lugar de coleta	Data da coleta	Amostra de solo/hospedeiro
ESALQ-3300	Bioma Mata Atlântica	11/04/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3299	Bioma Pampa	16/04/2013	Vegetação Nativa
h33.I*	Bioma Cerrado	30/01/2013	Cultivo de Milho
h89.I*	Bioma Cerrado	30/01/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3298	Bioma Cerrado	30/01/2013	Cultivo de Milho
h157.III*	Bioma Cerrado	30/01/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-4683	Bioma Amazônia	23/03/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3311	Bioma Amazônia	23/03/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3313	Bioma Amazônia	23/03/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3314	Bioma Amazônia	23/03/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3312	Bioma Amazônia	23/03/2013	Cultivo de Milho
e162.I*	Bioma Amazônia	23/03/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3297	Bioma Cerrado	30/01/2013	Vegetação Nativa
i48.I*	Bioma Cerrado	30/01/2013	Cana-de-açúcar
ESALQ-3315	Bioma Amazônia	09/03/2013	Cultivo de Banana
ESALQ-3295	Bioma Caatinga	10/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3296	Bioma Caatinga	10/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3294	Bioma Caatinga	10/09/2013	Vegetação Nativa
p9.I*	Bioma Mata Atlântica	06/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3309	Bioma Mata Atlântica	06/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3310	Bioma Mata Atlântica	06/09/2013	Vegetação Nativa
p145.I*	Bioma Mata Atlântica	06/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3293	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-3292	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-3291	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de feijão
ESALQ-3290	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-3289	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-3288	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-4335	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-3287	Bioma Caatinga	10/09/2013	Cultivo de Palma
ESALQ-3282	Bioma Amazônia	21/09/2013	Vegetação Nativa
q45.I*	Bioma Amazônia	21/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3283	Bioma Amazônia	21/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3285	Bioma Amazônia	21/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3284	Bioma Amazônia	21/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3286	Bioma Amazônia	21/09/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3276	Bioma Amazônia	13/09/2013	Cultivo de Banana
ESALQ-3277	Bioma Amazônia	13/09/2013	Cultivo de Banana
ESALQ-3275	Bioma Amazônia	05/09/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3274	Bioma Amazônia	05/09/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3272	Bioma Amazônia	05/09/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3271	Bioma Amazônia	05/09/2013	Cultivo de Milho

Anexo A - Identificação e procedência dos isolados do fungo *I. fumosorosea*, utilizados nos experimentos

(conclusão)

Cod. ESALQ	Lugar de coleta	Data da coleta	Amostra de solo/hospedeiro
ESALQ-3273	Bioma Amazônia	05/09/2013	Cultivo de Milho
ESALQ-3279	Bioma Cerrado	03/06/2013	Cana-de-açúcar
ESALQ-3278	Bioma Cerrado	03/06/2013	Cana-de-açúcar
ESALQ-3281	Bioma Cerrado	04/06/2013	Vegetação Nativa
ESALQ-3280	Bioma Cerrado	04/06/2013	Vegetação Nativa
j100.II*	Bioma Cerrado	04/06/2013	Vegetação Nativa
j160.IV*	Bioma Cerrado	04/06/2013	Vegetação Nativa

*Isolados não foram preservados e mantidos na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, Piracicaba – SP e por isso não apresentam número ESALQ