

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA FERREIRA AMATUZZI

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE SOLOS AGRÍCOLAS
E MATA NATIVA PARA O CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* ZELLER
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM MORANGUEIRO

Curitiba
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA FERREIRA AMATUZZI

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE SOLOS AGRÍCOLAS
E MATA NATIVA PARA O CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* ZELLER
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM MORANGUEIRO

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora no Curso de Pós
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia pela Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadora: Dr^a Maria A. Cassilha Zawadneak

Curitiba

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Amatuzzi, Rafaela Ferreira

Prospecção de fungos entomopatogênicos de solos agrícolas e mata nativa para o controle de *Duponchella fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em morangueiro. / Rafaela Ferreira Amatuzzi. – Curitiba, 2018. 115 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadora: Maria A. Cassilha Zawadneak

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Lepidoptero. 2. Pragas – Controle biológico. 3. Morango - Doenças e pragas. I. Título II. Pimentel, Ida Chapaval. III. Zawadneak, Maria A. Cassilha. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 634.75



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Prospecção de Fungos Entomopatogênicos de Solos Agrícolas e de Mata Nativa para o Controle de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em Morangueiro”

por

Rafaela Ferreira Amatzuzi

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof.ª. Dra. Ida Chapavai Pimentel (Presidente)

Prof. Dr. Alex Sandro Poltronieri

Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Dra. Magda Fernanda Paixão

Dra. Emily Silva Araujo

Curitiba, 06 de julho de 2018.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, à minha mãe Maria Madalena Ferreira e companheiro Paulo Henrique Meller que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”

Ao Curso de PGMPP da UFPR, e às pessoas com quem convivi nesse espaço ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação acadêmica.

As Professoras Dra. Ida Chapaval Pimentel, Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak pela orientação e grande desprendimento em ajudar e amizade sincera.

Ao Professor Dr. Alex Sandro Poltronieri e Msc. Carolina Gracia Poitevin e aos colegas do LabMicro pela grande ajuda na realização deste trabalho.

As empresas BioAgro e Novozymes, a primeira pela doação de mudas de morangueiro e a segunda por disponibilizar os bioinseticidas comerciais utilizados neste estudo.

A CAPES pela bolsa de doutorado e o CNPq pelo financiamento (CNPq 38/2013 - Linha temática 03 - Métodos alternativos de controle fitossanitário) deste projeto.

Resumo Geral

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga introduzida recentemente na cultura de morangos no Brasil. O controle químico não é eficaz na redução da população deste inseto- praga devido o hábito críptico das larvas. O uso do controle microbiano reduz as aplicações de pesticidas, controlando a densidade populacional das pragas. Os fungos entomopatogênicos são comuns em ambientes terrestres, especialmente no solo, e são importantes reguladores naturais das populações de insetos através da infecção por ação de contato. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos entomopatogênicos de solos de mata nativa e agrícolas a fim de avaliar a patogenicidade e a virulência desses fungos contra larvas de 3º ínstar de *D. fovealis* em laboratório e em casa de vegetação e observar o efeito endofíticos dos fungos em larvas de 1º e 3º ínstars em mudas de morangueiro colonizadas, para encontrar alternativas para o manejo desta praga. Foram obtidos 20 isolados de diferentes solos próximos a cultivos de milho, cultivos convencionais e orgânicos de morangueiro e de solos de matas nativas pertencentes às espécies *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, *Isaria javanica* e o gênero *Lecanicillium*. Em relação à patogenicidade a mortalidade variou entre 10 e 88% e dois isolados de *B. bassiana* e *I. javanica* (Bea111 e Isa340) apresentaram taxas de mortalidade acima de 80% contra larvas de *D. fovealis* de 3º ínstar. Nos bioensaios de virulência a CL₅₀ dos isolados Bea111 e Isa340 foram de $2,33 \times 10^6$ e $9,69 \times 10^5$ conídios/mL respectivamente. A eficácia dos isolados de *B. bassiana* e *I. javanica* (Bea111 e Isa340) em condições de casa de vegetação foi aproximadamente de 50%. Os dois isolados de *B. bassiana* e *I. javanica* apresentaram efeito endofítico em larvas de 1º e 3º ínstars, quando colonizaram as folhas de morangueiro, induzindo a mortalidade das larvas entre 12 e 30%. Os resultados gerais desta tese indicam o potencial dos isolados de *B. bassiana* e *I. javanica* como agentes de controle biológico contra *D. fovealis* em laboratório e em casa de vegetação como alternativa aos inseticidas químicos tradicionais empregados atualmente. Esta é a primeira vez que os fungos entomopatogênicos isolados do solo foram testados contra *D. fovealis*.

Palavras-chave: *Fragaria ×ananassa*; *Beauveria bassiana*; *Isaria javanica*; Lagarta- da- coroa; Agentes de controle biológico.

General Review

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidoptera: Crambidae) is a recently introduced pest in strawberry crops in Brazil. The chemical control is not effective in reducing the population of this insect-pest due to the cryptic habit of the larvae. The use of microbial control reduces pesticide applications by controlling the population density of pests. Entomopathogenic fungi are common in terrestrial environments, especially in soil, and are important natural regulators of insect populations through contact action infection. The objective of this study was to isolate entomopathogenic fungi from native and agricultural forest soils to evaluate the pathogenicity and virulence of these fungi against 3rd instar *D. fovealis* larvae in laboratory and in greenhouse conditions and observe the endophytic effect of this fungi on 1st and 3rd instar larvae in colonized strawberry seedlings, to find alternatives for the management of this pest. Were obtained twenty isolates of *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, *Isaria javanica* and the genus *Lecanicillium* from different soils close to maize, conventional and organic strawberry crops and native soils. In pathogenicity tests, mortality ranged from 10 to 88% and two isolates of *B. bassiana* and *I. javanica* (Bea111 and Isa340) presented mortality rates above 80% against 3rd instar *D. fovealis* larvae. In the virulence bioassays, LC₅₀ of the isolates Bea111 and Isa340 were 2.33×10^6 and 9.69×10^5 conidia/mL, respectively. The efficacy of *B. bassiana* and *I. javanica* isolates (Bea111 and Isa340) under greenhouse conditions was approximately 50%. The two isolates of *B. bassiana* and *I. javanica* showed an endophytic effect in 1st and 3rd instar larvae, when they colonized the strawberry leaves, inducing larval mortality between 12 and 30%. The general results of this thesis indicate the potential of the isolates of *B. bassiana* and *I. javanica* as biological control agents against *D. fovealis* in the laboratory and in the greenhouse as an alternative to the traditional chemical insecticides currently used. This is the first time that entomopathogenic fungi isolated from soil have been tested against *D. fovealis*.

Keywords: *Fragaria ×ananassa*; *Beauveria bassiana*; *Isaria javanica*; European pepper moth; Biological control agents.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DA MICRO MARIPOSA DA ESPÉCIE <i>Duponchelia fovealis</i>	22
FIGURA 2- CICLO DE INFECÇÃO FÚNGICA EM INSETOS.....	26

CAPÍTULO II

FIGURA 1- AMOSTRAS DE COLÔNIAS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO SOLO	49
FIGURA 2- PORCENTAGEM DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DE SOLOS	49

CAPÍTULO III

FIGURA 1- EXTRUSÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DOS CORPOS DAS LARVAS MORTAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>D. fovealis</i> . A- <i>Lecanicillium</i> sp.; B- LAGARTA MORTA; C- <i>I. javanica</i> ; D- <i>B. caledonica</i> ; E- <i>M. anisopliae</i> ; F- <i>B. bassiana</i>	63
FIGURA 2- MORTALIDADE DAS LARVAS FRENTE AOS ISOLADOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	64
FIGURA 3- PORCENTAGEM DE LARVAS DE <i>Duponchelia fovealis</i> INFECTADAS APÓS A INOCULAÇÃO COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE CONÍDIOS DIFERENTES DE TRÊS ESPÉCIES DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS: DOIS ISOLADOS DE <i>B. bassiana</i> (Bea1 e Bea111), UM ISOLADO DE <i>B. caledonica</i> (Bea110) E UM ISOLADO DE <i>I. javanica</i> (Isa340).....	65

CAPÍTULO IV

FIGURA 1 – COLONIZAÇÃO DE FRAGMENTOS FOLIARES POR <i>B. bassiana</i> –BEA111 (A) E BOV2 (B) e <i>I. javanica</i> - ISA340 (C).	83
FIGURA 2 – MORTALIDADE DE LARVAS DE 1º ÍNSTAR EM TRÊS INTERVALOS DE TEMPOS DIFERENTES.	84
FIGURA 3- MORTALIDADE DE LARVAS DE 3º ÍNSTAR EM TRÊS INTERVALOS DE TEMPOS DIFERENTES.	85
FIGURA 4 - MORTALIDADE DE LARVAS DE 1º E 3º ÍNSTARES ENTRE OS TRATAMENTOS BEA111, BOV 2 E ISA340	85
FIGURA 5 - EXTRUSÃO DOS FUNGOS EM LARVAS DE <i>D. fovealis</i> - 1º ÍNSTAR IMAGENS A,B,C e 3º ÍNSTAR IMAGENS D,E,F. <i>B. bassiana</i> BEA111 (A;D), BOV2 (B;E), <i>I. javanica</i> ISA340 (C;F).....	87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1- RELAÇÃO DAS LOCALIDADES DE COLETA AMOSTRAS DE SOLOS REALIZADAS NO ESTADO DO PARANÁ	44
TABELA 2- SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES GENÔMICAS DO DNA FÚNGICO	47
TABELA 3. FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO (%) DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE SOLOS DE MATA E DE SISTEMAS DE CULTIVOS.....	50

CAPÍTULO III

TABELA 1. RELAÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS CONTRA LARVAS DE <i>D. fovealis</i>	59
TABELA 2- A ANÁLISE DE REGRESSÃO DA MORTALIDADE PROBIT E LOG-CONCENTRAÇÃO DE DADOS DE BIOENSAIOS CONTRA LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>D. fovealis</i>	66
TABELA 3. PORCENTAGEM MÉDIA DE LARVAS DE <i>D.fovealis</i> VIVAS E A EFICÁCIA DE <i>B. bassiana</i> E <i>I. javanica</i> APÓS OS SETE DIAS DO TRATAMENTO EM MUDAS DE MORANGUEIRO EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO	67

CAPÍTULO IV

TABELA 1 – FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DOS TRATAMENTOS BEA111, BOV2 E ISA340 EM RELAÇÃO OS INTERVALOS DE TEMPO DE SETE, VINTE E UM E TRINTA CINCO DIAS. COLUNAS: CLASSIFICAÇÃO COM LETRAS EM MINÚSCULAS E LINHAS APRESENTAM A CLASSIFICAÇÃO EM LETRAS MAIÚSCULAS. TUKEY P<0.05.	88
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CL₅₀ - CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA

TL₅₀ - TEMPO LETAL MÉDIO

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA TESE	15
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2 RESUMO DA BIBLIOGRAFIA	19
2.1 Introdução	19
2.2 Morangueiro	20
2.3 Lagarta-da-coroa	22
2.4 Controle biológico.....	25
2.5 Fungos entomopatogênicos.....	26
2.5.1 <i>Beauveria bassiana</i>	28
2.5.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
2.5.3 <i>Isaria javanica</i>	31
REFERENCIAS.....	33
CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE SOLOS DE CULTIVO E MATA NATIVA E PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Duponchelia fovealis</i> ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	41
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Amostras de solo.....	44
2.2 Isolamento e cultivo dos fungos	45
2.3 Identificação das colônias fúngicas	46
2.3.1 Identificação macromorfológica e micromorfológica.....	46
2.3.1.1 Microcultivo	46
2.3.2 Identificação molecular.....	47
2.3.2.1 Extração de DNA.....	47
2.3.2.2 Amplificação de regiões do genoma fúngico	48
2.3.2.3 Purificação do DNA e Reação de sequenciamento.....	48
2.3.2.4 Edição e análise das sequências	49

3 RESULTADOS	49
4 DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	53
.....	57
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE DE LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO.....	57
1 INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1 Bioensaio de Patogenicidade.....	60
2.3 Bioensaio de virulência.....	61
2.4 Testes de eficiência dos fungos entomopatogênicos em casa de vegetação .	62
2.5 Análise estatística	63
3 RESULTADOS	63
3.1 Bioensaio de patogenicidade	63
3.2 Bioensaio de virulência.....	65
3.3 Testes de eficiência dos fungos entomopatogênicos em casa de vegetação .	67
4 DISCUSSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO 4: EFEITO ENDOFÍTICO DE <i>Beauveria Bassiana</i> E <i>Isaria javanica</i> EM BIOENSAIO COM PLANTAS DO MORANGUEIRO PARA O CONTROLE DA LAGARTA-DA-COROA <i>Duponchelia fovealis</i>	76
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1 Criação de <i>D. fovealis</i>	79
2.2. Linhagens de fungos entomopatogênicos	80
2.3. Obtenção das mudas de morangueiro	80
2.4. Inoculação de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Isaria javanica</i> em mudas de morangueiro	81
2.5. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos inoculados em mudas de morangueiro sobre larvas de <i>D. fovealis</i>	82

2.6. Colonização de plantas de morangueiro por fungos entomopatogênicos	83
2.7. Análise estatística	83
3 RESULTADOS	84
4 DISCUSSÃO	89
REFERÊNCIAS.....	90
DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	96
REFERENCIAS GERAIS	98

Capítulo

1

Revisão da Tese

1 INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch) está entre as espécies cultivadas com maior suscetibilidade a pragas e doenças (ANTUNES et al., 2015). Dentre os insetos que reduzem a produção e qualidade dos frutos do morangueiro atualmente é a espécie exótica *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae recentemente introduzida), recentemente introduzida no Brasil (ZAWADNEAK et al., 2014).

Larvas desta espécie infestam cultivos e se mantem presentes durante todo o ciclo do morangueiro e seu potencial de dano representa um sério problema na cultura. Atualmente, o controle é realizado através da aplicação de inseticidas de alta toxicidade com elevado número de pulverizações causam contaminações ambiental e humana, além de comprometerem os serviços de ecossistemas como o controle biológico natural (MEYLING; EILENBERG, 2007; ZAWADNEAK et al., 2014).

O controle biológico é um fenômeno que consiste na regulação da população de pragas por organismos predadores, parasitoides ou patógenos denominados agentes de controle biológico (PARRA et al., 2002).

O uso do controle biológico apresenta vantagens em relação ao controle químico (MEYLING; EILENBERG, 2006). É uma medida atóxica, não provoca desequilíbrios ecológicos, propicia equilíbrio na densidade populacional de pragas e é eficiente quando pesticidas químicos não diminuem significativamente a população da praga, como no caso de infestações por *D. fovealis*, sendo uma alternativa ao uso exclusivo de pesticidas químicos com benefícios para os consumidores, agricultores e o meio ambiente (MEYLING; EILENBERG, 2007).

Os fungos entomopatogênicos são potenciais agentes de controle de pragas em agroecossistemas. Quando em contato com o inseto, infectam e causam doenças que levam a morte rápida do hospedeiro (HIBBETT et al., 2007; BLACKWELL, 2009). Frequentemente isolados de solos, a diversidade varia com a localização geográfica, clima, habitat, altitude, pH, matéria orgânica e manejo de

cultivos convencionais e orgânicos (MEYLING; EILENBERG, 2006; MEYLING; EILENBERG, 2007; MEDO et al., 2010).

Nesse sentido o conhecimento e estudos sobre a diversidade de fungos entomopatogênicos de solo de diferentes ambientes é de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos biológicos que podem ser utilizados no controle de pragas (FERNANDES et al., 2010).

2 OBJETIVOS

Isolar fungos entomopatogênicos de solos agrícolas e de mata nativa no estado do Paraná a fim de avaliar o potencial entomopatogênico e para a redução da população praga de *D. fovealis*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Isolar fungos entomopatogênicos de amostras de solo de áreas agrícolas e de mata nativa;

II. Identificar os fungos em nível de gênero pela macromorfologia e micromorfologia e em nível de espécie através de regiões específicas do genoma fúngico;

IV. Avaliar as espécies entomopatogênicas em testes de mortalidade contra larvas de terceiro ínstar de *Duponchelia fovealis* em condições laboratoriais e de casa de vegetação;

V. Avaliar o potencial de colonização endofítica dos fungos isolados do solo em morangueiro e o efeito na mortalidade de larvas de 1º e 3º ínstar de *Duponchelia fovealis*.

Para organizar os diferentes tópicos abordados, a tese é apresentada em quatro capítulos:

Capítulo I - Revisão da bibliografia;

Capítulo II – Isolamento dos fungos entomopatogênicos do solo;

Capítulo III – Bioensaios de mortalidade em condições de laboratório e casa de vegetação contra larvas de *D. fovealis*;

Capítulo IV – Inoculação dos fungos entomopatogênicos em mudas de morangueiro para o estabelecimento desses fungos como endófitos.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de pragas na cultura do morangueiro pode causar diversos prejuízos à sua produção e estão diretamente ligados à destruição das partes aéreas da planta, ataque ao fruto, redução do ciclo e produção da planta (BOTTON et al., 2010).

O morangueiro apresenta alta suscetibilidade a pragas e doenças (ANTUNES et al., 2011). Esta condição exige do produtor um contínuo esforço de manejo, como a aplicação de agroquímicos de forma indiscriminada e exagerada, para que o fruto apresente aparência ideal para comercialização e a produção seja lucrativa (ANTUNES; FILHO, 2005). Porém o abuso do controle químico ocasiona desequilíbrios ambientais, como a eliminação de polinizadores e inimigos naturais, resistência aos inseticidas e ressurgimento de pragas (NONDILLO et al., 2009).

Dentre os insetos que reduzem a produção e qualidade dos frutos do morangueiro, destaca-se a espécie exótica invasora, a lagarta-da-coroa *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae). O manejo da espécie no cultivo do morangueiro vem sendo feito através da aplicação de inseticidas de alta toxicidade, muitas vezes não autorizados para uso na cultura (ZAWADNEAK et al., 2014).

A preocupação com o impacto ambiental e a saúde humana pelo uso de inseticidas químicos dá urgência a busca de alternativas de base biológica de controle de pragas (CHARNLEY; COLLINS, 2007).

O controle biológico de espécies invasoras de artrópodes tem sido considerado seguro, eficaz e ambientalmente seguro para o manejo de pragas (MESSING; WRIGHT, 2006).

Entre os diferentes grupos de agentes entomopatogênicos, os fungos, possuem características que os tornam adequados para o seu uso no controle biológico (CHARNLEY; COLLINS, 2007). Infectam várias espécies de pragas pela penetração direta da cutícula elevando o potencial em causar epizootias que

ocasionam alta mortalidade na população de pragas, habitam diversos tipos de solos, são encontrados naturalmente em artrópodes e em plantas como endófitos ou epifíticos (HAJEK; DELALIBERA, 2010).

2.2 MORANGUEIRO

O morangueiro é uma planta pertencente à família das rosáceas, originária de regiões de clima temperado da Europa e das Américas (ANTUNES; SANTOS, 2011).

A espécie comercialmente cultivada (*Fragaria* × *ananassa*) é proveniente da hibridação entre as espécies *Fragaria chiloensis* Mill. e *Fragaria virginiana* Duch, realizada na França, por volta de 1750, por serem cultivadas lado a lado, cujo os frutos apresentam polpa de coloração vermelha e tamanho maior em relação as espécies não comerciais (ANTUNES; SANTOS, 2011; ANTUNES et al., 2015).

A planta possui um sistema radicular fasciculado e superficial de cor amarelo pardo. As raízes nascem adventiciamente a partir da base das folhas novas ao longo da coroa (PALHA, 2005). O caule é um rizoma estolhoso curto e com formato cilíndrico e retorcido que se ramifica e do qual emergem as folhas trifoliadas formando a região da coroa (ALMEIDA, 2006).

As folhas são constituídas por três folíolos pilosos em espiral. O tempo entre a emergência das folhas é de cerca de 8 a 12 dias e cada uma delas tem uma duração que varia entre um a três meses durante primavera e verão. O pecíolo das folhas possui na sua base duas estípulas de proteção, onde se encontram os gomos, os quais podem evoluir em estolhos ou em novas coroas (ALMEIDA, 2006).

A inflorescência é terminal, emergindo das estípulas-bainha da folha. O eixo de crescimento da inflorescência termina numa flor primária que mantém uma posição dominante no desenvolvimento da inflorescência, na sequência se formarão duas flores secundárias, quatro flores terciárias e oito flores quaternárias (MIRANDA; FERNANDES, 2001).

As flores primárias de cada inflorescência são as primeiras a frutificarem produzindo os frutos de maiores dimensões. As flores secundárias e terciárias, como possuem menor número de pistilos, produzirão frutos menores (ALMEIDA, 2006).

As flores são pentâmeras, agrupando-se em corimbos e possuem pedúnculos compridos revestidos de pelos. As pétalas são de cor branca e de forma variável, variando desde elíptica a oval. A flor possui entre 20 e 30 estames e um número de pistilos que pode variar entre os 60 e os 600, dispostos em espiral sobre um grande receptáculo. Os estames estão dispostos ao redor e sobre os ovários. (MIRANDA; FERNANDES, 2001).

A cultura do morangueiro no Brasil tem uma expressão econômica muito forte dentro do grupo das pequenas frutas e é apreciado nas mais variadas regiões do mundo. A produção mundial em 2015 foi de 8,1 milhões de toneladas, em uma área de 373,4 mil hectares (FAO, 2017).

No Brasil, a estimativa de produção de morango atualmente é cerca de 155 mil toneladas, e área cultivada em torno de 4.300 hectares, sendo os estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, os maiores produtores da fruta (FACHINELLO, 2001; ANTUNES et al., 2015). A grande parte desta produção é realizada em sistema convencional e estima-se que apenas 1% de toda área é cultivada em sistema orgânico (DAROLT, 2008).

O morango é um fruto perecível e suscetível a mais de 20 pragas e doenças associados a todos os estágios do cultivo do morangueiro (ANTUNES et al., 2011). Fatores como clima, presença de inimigos naturais, qualidade das linhagens das plantas e manejo do solo influencia diretamente na densidade populacional de uma espécie-praga (BERNARDI et al., 2015).

Dentre as pragas destacam-se as espécies de ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch e ácaro-do-enzepamento; *Phytonemus pallidus* Banks das famílias Tetranychidae e Tarsonemidae respectivamente; espécies de moluscos *Helix aspersa* Muller, *Strophocheilus oblongus* Noricand, *Bradybaena similaris* Férussac e *Deroceras laeve* Müller; fungos da espécie *Botrytis cinerea* e gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Verticillium* e *Cylindrocladium* e

espécies de insetos de diversas ordens como Broca-o-morango, *Lobiopa insularis* Castelnau (Coleoptera: Nitidulidae); Lagartas desfolhadoras, *Spodoptera eridania* Cramer e *S. frugiperda* Smith, (Lepidoptera: Noctuidae); Lagarta-da-coroa do morangueiro, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae); Drosófila-da-asa-manchada, *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae); Mosca-branca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae); Pulgões das espécies *Icapitophorus fragaerolli* Cockerell e *Cerosipha forbes* Weed e *Aphis forbesi* Weed (Hemiptera: Aphididae); Tripes, *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae); Percevejo-dos-frutos, *Neopamera bilobata* Say (Hemiptera: Rhyparochromidae) (BERNARDI et al., 2015).

As principais consequências das infestações das partes aéreas das plantas pelas pragas do morangueiro são deformações, deterioração, manchas e diminuição dos frutos, desfolhamento, perda de vigor, redução na produção, murchamento permanente, atrofiamento e morte das plantas (ANTUNES et al., 2011).

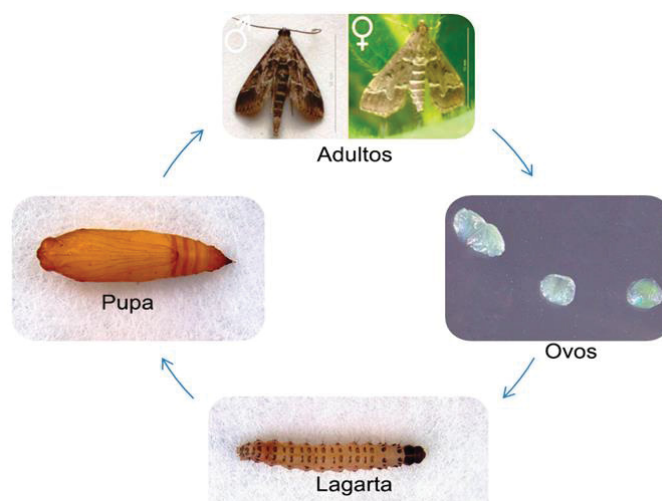
A aplicação de defensivos químicos é o método mais empregado na cultura do morangueiro para o controle das infestações, porém, atualmente existe uma cobrança cada vez maior por parte das agências de controle e da população para que frutos como o morango sejam produzidos de maneira sustentável, exigindo por parte dos agricultores o emprego de boas práticas agrícolas, dentre elas a redução do uso de agrotóxicos (BERNARDI et al., 2015).

2.3 LAGARTA-DA-COROA

A mariposa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera, Crambidae) é uma espécie exótica invasora, nativa da região sul da Europa e Mediterrâneo. É considerada uma praga estabelecida na Europa, Oriente Médio, África e América do Norte (STOCKS; HODGES, 2011). No Brasil, esta praga está disseminada entre os estados do Paraná, Espírito Santo e Minas Gerais na cultura do morangueiro (ZAWADNEAK et al., 2014).

O ciclo de vida dura 40 ± 2 dias (FIGURA 1) e as fêmeas podem gerar em média 300 ± 62.3 ovos. Os ovos são de coloração creme medindo em média $0,3 \times 0,6$ mm de largura e comprimento respectivamente, com formato elíptico, quando próximos à eclosão, passam a ter coloração avermelhada. Podem ser depositados de forma isolada ou em grupo de 3 a 10 unidades e a eclosão das larvas levam em média 5 dias (ZAWADNEAK et al., 2017).

FIGURA 1- CICLO DE VIDA DE *Duponchelia fovealis*.



FONTE: O autor (2018).

A fase larval ocorre entre 20 a 25 dias dentro do ciclo de vida. As larvas são de coloração branco-creme a marrom-clara, medem cerca de 20 mm de comprimento no último ínstar. A cabeça é de cor marrom escura, com manchas escuras no corpo (STOCKS; HODGES, 2011).

A formação do casulo leva em torno de 5 dias e possui dimensões entre 15 a 19 mm por 9 a 12 mm de comprimento, é feito de excrementos e partículas do solo, com coloração amarelo pardo, tornando-se mais escura quando próxima da emergência (ZAWADNEAK et al., 2017).

Os adultos têm uma envergadura de 19 a 21 mm por 10 mm de comprimento (STOCKS; HODGES, 2011). As asas são de coloração marrom, com duas finas linhas transversais amarelas e paralelas entre si. A linha mais perto do ápice da asa apresenta um desenho em forma de U na região central. Os machos

têm abdome mais afilado e com um tufo de pelos na sua extremidade. A cabeça e tórax são de coloração oliva-marrom e abdômen coloração creme com anéis que o rodeiam e pernas são castanhas claro (BERNARDI et al., 2015).

A mariposa possui hábito polífago e está presente em mais de 73 hospedeiros, incluindo espécies de plantas de interesse econômico como: *Apium graveolens* L. (aipo), *Begonia tuberosa* Voss (planta ornamental), *Beta vulgaris* L. (beterraba), *Capsicum annuum* L. (pimenta), *Ficus triangularis* Warb. (figo), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Rubus fruticosus* L. (amora), *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Cucumis* sp. (pepino), *Fragaria* × ananassa Dush. (morango), *Lactuca* sp. (alface silvestre), *Phalaenopsis* sp. (orquídea), *Rhododendro* sp. (azaléia), *Zea mays* L. (milho).

No Brasil, a espécie foi detectada em 2008 nos inventários da entomofauna associada ao cultivo do morangueiro pela equipe do Grupo Técnico da Produção Integrada do Morangueiro (PIMo) - Paraná, no Município de São José dos Pinhais, região Metropolitana de Curitiba e identificada de 2010 no Laboratório de Entomologia Sistemática do *United States Department of Agriculture* (USDA). (ZAWADNEAK et al., 2014).

Os principais sintomas estão associados à alimentação das larvas de *D. fovealis* (ZAWADNEAK et al., 2014). As folhas apresentam furos e encontram-se murchas ou secas em função do broqueamento na região da coroa da planta e flores e os frutos danificados (BERNARDI et al., 2015).

Na planta infestada há presença abundante de teia e excrementos (BERNARDI et al., 2015). Em infestação severa as plantas ficam debilitadas, com baixa produtividade e morte precoce. O controle desta praga nas áreas infestadas não tem sido tarefa fácil devido ao seu pequeno tamanho, rápido crescimento populacional e hábitos crípticos (ZAWADNEAK et al., 2014; STOCKS; HODGES, 2011).

O manejo da praga consiste na limpeza constante das plantas adultas com a retirada de folhas senescentes do baixeiro que estão em contato com o solo e detritos vegetais e das plantas infestadas, evitar encharcar o solo durante a irrigação e controle químico com pulverização de Clorfenapir (2 mg/Kg) e

Novaluron (0,1 mg/Kg) mediante a presença da praga no cultivo (BERNARDI et al., 2015; ANVISA, 2018).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação da população de organismos vivos por seus inimigos naturais em um ecossistema (PARRA et al., 2002).

Em um sistema agrícola, pode ser definido como controle de populações de pragas por agentes de controle biológico que são classificados em parasitoides, predadores ou patógenos, que mantêm a densidade populacional da praga em equilíbrio, abaixo do nível de dano econômico (HAJEK; DELALIBERA, 2010).

A aplicação do controle biológico é uma alternativa aos pesticidas químicos no manejo integrado de pragas (MIP), com benefícios para os consumidores, agricultores e o meio ambiente (ALTIERI, 2004). Pode ser aplicado junto a outros métodos de controle, como o cultural, físico, comportamentais (feromônios) e químicos, com produtos seletivos (PARRA et al., 2002).

Existem três conceitos básicos de controle biológico denominado: controle biológico natural, controle biológico aplicado e o controle biológico clássico (PARRA et al., 2002).

O controle biológico natural refere-se aos inimigos que habitam o ecossistema, responsáveis pela mortalidade natural das pragas no ambiente. Em contrapartida o controle biológico aplicado aborda a criação em massa em laboratório do agente biológico para liberação em grande quantidade do organismo no ambiente, visando à rápida redução do organismo alvo, nesse tipo de controle não se espera o estabelecimento do agente liberado nas áreas tratadas (PARRA et al., 2002).

O controle biológico clássico é definido como a introdução intencional de um agente de controle biológico exótico para estabelecimento permanente e de longo prazo de controle de pragas (EILENBERG; HAJEK, 2001). Esse tipo de

controle tem sido frequentemente usado quando espécies exóticas invasoras se estabelecem em uma nova área e atingem alta densidade populacional (KEANE; CRAWLEY, 2002; HAJEK; DELALIBERA, 2010).

2.5 FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS

Os fungos entomopatogênicos são caracterizados por possuírem habilidade em infectar e causar doenças em uma ampla gama de insetos e outros artrópodes (HIBBETT et al., 2007; MEYLING; EILENBERG, 2007; PELL et al., 2010).

Existem mais de 100 espécies de fungos entomopatogênicos e estão distribuídas nas ordens Hypocreales e Entomophthorales (MEYLING; EILENBERG, 2007).

As principais espécies são: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Beauveria amorpha* (Höhnelt) Minni, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, *Beauveria caledonica* Bissett & Widden, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., *Metarhizium album* Petch, *Metarhizium acridum* Driver & Milner, *Lecanicillium lecanii* Zimmermann, *Entomophthora muscae* Cohn, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Cordyceps militaris* L., *Isaria javanica* (Friedrichs & Bally) Samson & Hywel-Jones, *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr., *Isaria fumosorosea* (Wize) Bull. (LIMA, 1989; ALVES, 1998; MEYLING; EILENBERG, 2007; ZIMMERMANN, 2007b; REHNER et al., 2011)

Os fungos entomopatogênicos podem ser encontrados em diversos ambientes, principalmente o solo, habitat natural e favorável para uma grande diversidade de espécies, onde permanecem uma significativa parte de seu ciclo de vida, quando estão fora do hospedeiro (KELLER; ZIMMERMAN, 1989; MEYLING et al., 2007).

São fundamentais na regulação da população de insetos pragas (QUESADA-MORAGA et al., 2007), permanecem dormentes no solo e sua persistência depende de vários fatores abióticos e bióticos, como temperatura,

potencial de umidade/água, agroquímicos, microbiota do solo, vegetação e artrópodes que habitam o solo (KELLER; ZIMMERMAN, 1989).

Os patógenos de insetos, como Baculovírus e *Bacillus thuringiensis* Berliner, devem ser ingeridos pelo hospedeiro para iniciar o processo de infecção, entretanto os fungos entomopatogênicos apresentam a vantagem de infectar, qualquer fase do desenvolvimento, por penetração direta da cutícula os artrópodes, portanto, são agentes especialmente adequados para controlar uma ampla gama de pragas (HAJEK; DELALIBERA, 2010).

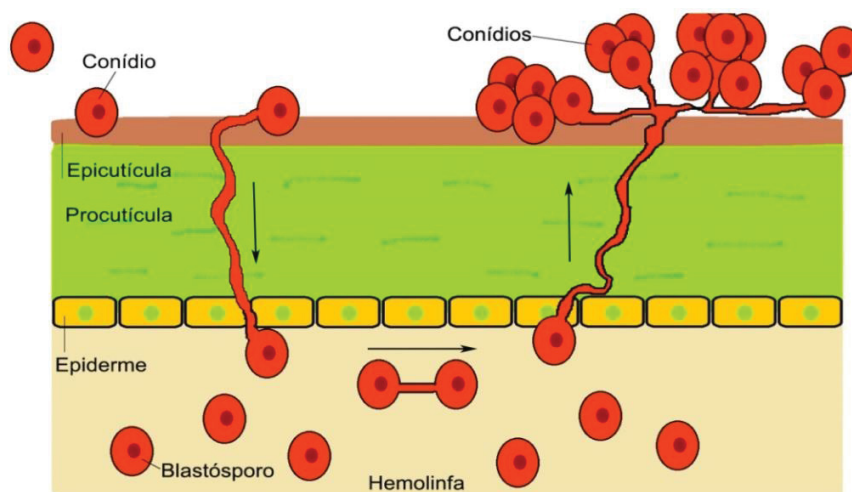
O ciclo de infecção fúngica (FIGURA 2) inicia-se pela adesão do esporo sobre a cutícula do inseto que irá germinar produzindo um tubo germinativo que formará o apressório, local de elevada atividade metabólica para auxiliar na penetração no hospedeiro ou a formação de uma massa mucilaginosa ao redor do tubo germinativo para a adesão e produção de enzimas extracelulares (HAJEK; LEGER, 1994; ALVES, 1998).

Na fase de penetração as hifas pressionam o tegumento do inseto rompendo-o junto com a ação de enzimas (proteases, lipases e quitinases), as quais facilitam a penetração mecânica do fungo (ALVES, 1998).

A cutícula é uma grande barreira mecânica e química que pode dificultar ou impedir a entrada do fungo na hemocele do inseto devido a características estruturais tais como esclerotização, que impede a penetração, através do endurecimento do tegumento e tirosinases que geram melaninas antimicrobianas (CHARNLEY, 2003).

A partir da penetração inicia-se a colonização do hospedeiro, com a ramificação das hifas a partir do tegumento até a hemocele, onde o fungo colonizará, com auxílio da secreção de micotoxinas, diversos órgãos, como os corpos gordurosos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso (HAJEK; LEGER, 1994; ALVES, 1998).

FIGURA 2- CICLO DE INFECÇÃO FÚNGICA EM INSETOS.



FONTE: O Autor (2018).

2.5.1 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin é um fungo entomopatogênico anamórfico cosmopolita, patógenos de artrópodes de importância agrícola, pertencente à ordem Hypocreales e a família Cordycipitaceae (LIMA, 1989).

A primeira descrição de *Beauveria bassiana* foi em 1835, por Agostino Bassi di Lodi da Itália. Ele observou uma doença em bichos-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), denominada "muscardina branca" e iniciou as primeiras experiências de infecção (REHNER et al., 2011).

O fungo foi descrito pelo por Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli e identificado como *Botrytis bassiana*, em homenagem a Bassi. Beauverie, em 1911 realizou uma nova descrição taxonômica do grupo e em 1912, Vuillemin criou o novo gênero *Beauveria* em homenagem a Beauverie, onde a *B. bassiana* tornou-se a espécie-tipo (LIMA, 1989; REHNER et al., 2011).

Beauveria bassiana é um dos agentes patogênicos mais importantes que afetam os insetos. É um parasita facultativo, que pode crescer tanto no hospedeiro como permanecer em vida livre no ambiente. É considerado um fungo cosmopolita por explorar uma variedade de ambientes, podendo viver como saprófito no solo,

como endófito em plantas, ou como um entomopatógeno (BOOMSMA et al., 2014).

Sua ampla gama de hospedeiros faz de *B. bassiana* um organismo adequado para controlar uma variedade de pragas (SUNG et al., 2006; CRUZ et al., 2006). *Beauveria bassiana* apresenta 707 espécies de hospedeiros insetos, estes compreendem 521 gêneros e 149 famílias de 15 ordens, além disso, 13 espécies hospedeiras de Acarina distribuídas em sete gêneros e seis famílias (ZIMMERMANN, 2007a).

O estudo realizado por Zeng (1999) observou infecção natural de *B. bassiana* sobre a formiga-de-fogo, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) distribuídas por toda América do Sul.

Em relação a pragas de cultivos, *B. bassiana* apresenta tropismo por insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera (ZIMMERMANN, 2007a).

Nos trabalhos de Viaud et al. (1996); Maurer et al. (1997) foi constatada a infecção de *B. bassiana* em várias famílias da ordem Lepidoptera como a broca-do-milho, *Ostrinia nubilalis* Hübner e a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* Fabr., pertencentes a família Crambidae; traça-das-cricíferas, *Plutella xylostella* Linnaeus da família Plutellidae; *Helicoverpa armigera* Hübner, e *Spodoptera littoralis* Boisduval pertencentes a família Noctuidae, pragas de vários cultivos como soja, algodão, cebola, morango e arroz.

Em Coleoptera, isolados de *B. bassiana* foram relatados como patogênicos ao gorgulho-da-água-do-arroz, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel e *Sitona lineatus* L. pertencentes à família Curculionidae e *Diabrotica speciosa* Germar (Chrysomelidae) (ZIMMERMANN, 2007a; BOOMSMA et al., 2014).

Atualmente, é aceito que *B. bassiana* forma um complexo de várias espécies crípticas que se posicionam filogeneticamente dentro da família Cordycipitaceae (STEPHEN et al., 2011).

Esta espécie é caracterizada por hifas septadas, hialinas e de parede lisa, com tamanho variando de 1-2 μm . Os conídios encontram-se aglomerados (cinco ou mais por grupo), com formato ovóide e base variando de subesférica a ampuliforme de tamanho médio entre 3 e 6 μm (STEPHEN et al., 2011) e

apresentam revestimento de hidrofobinas para aderência à cutícula do inseto (HOLDER; KEYHANI, 2005).

Em insetos, a germinação dos conídios ocorre em 12 horas após inoculação e após 72 horas da inoculação, o hospedeiro se encontra totalmente colonizado, apresentando grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie definidos como globosos ou sub-globosos com $2 \text{ a } 3 \times 2,5 \mu\text{m}$, com conidióforos formando densos cachos (FUXA, 1987).

A duração das diferentes fases do ciclo da relação patógeno-hospedeiro depende das condições existentes durante a ocorrência da doença, sendo favorecida pela umidade relativa em torno de 90% e de temperatura na faixa de 23 a 28°C (ALVES, 1998).

2.5.2 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin é um dos fungos entomopatogênicos mais estudados e utilizados no controle biológico de pragas, pertence à ordem Hypocreales e a família Clavicipitaceae. Infecta um amplo grupo de artrópodes através da secreção de toxinas específicas como destruxinas e citocalasinas (DRIVER et al., 2000).

Foi isolado de mais de 200 espécies em 17 famílias de insetos e ácaros e compreende 33,9% dos pesticidas microbianos feitos de fungos entomopatogênicos (ZIMMERMANN, 2007b).

Linhagens de *M. anisopliae* são eficazes contra uma ampla gama de hospedeiros de insetos pertencentes às ordens de Lepidoptera (*Helicoverpa armigera* Hübner, *Spodoptera littoralis* Boisduval), Hemiptera (*Ceratovacuna lanigera* Zehntner, *Maconellicoccus hirsutus* Green e *Nezara viridula* L.), Coleoptera (*Phyrdenus muriceus* Germar, *Diabrotica speciosa* Germar e *Diloboderus abderus* Sturm) e Diptera (*Musca domestica* L.) (ALVES, 1998; INGLIS et al., 2001; ZIMMERMANN, 2007b).

Possui distribuição cosmopolita, é encontrado comumente em solos, onde muitas vezes mostram uma estreita associação com raízes de plantas, em clima temperado e tropical (DRIVER et al., 2000).

De acordo com estudos sobre a população genética, existem genótipos de *M. anisopliae* que ocorrem em habitats em regiões temperadas e polares, e associações de genótipos de *M. anisopliae* com tendência a colonizar insetos hospedeiros que ocorrem em regiões subtropicais (KELLER; ZIMMERMAN, 1989; INGLIS et al., 2001).

A espécie *M. anisopliae* foi originalmente descrita por Metschnikoff (1879) como *Entomophthora anisopliae* e mais tarde transferido para o novo gênero *Metarhizium* por Sorokin em 1883 (DRIVER et al., 2000).

Os caracteres taxonômicos dominantes são as características morfológicas das colônias. O gênero é definido com base do arranjo das fiálides portadoras de cadeias e colunas de conídios geralmente, cilíndricos ou ligeiramente ovóides, secos e verdes. As colunas são formadas pela agregação das cadeias de conídios (ZIMMERMANN, 2007b).

2.5.3 *Isaria javanica*

O gênero entomopatogênico *Isaria* é cosmopolita e é frequentemente isolado de solos. Podem infectar diferentes ordens de insetos, mas apresenta uma maior tendência de infectar hospedeiros da ordem Lepidoptera. Produz várias micotoxinas que auxiliam no processo de infecção, como a beauvericina. (SAMSON, 1974; ZIMMERMAN, 2008)

O gênero *Paecilomyces* foi estabelecido por Bainier com base na espécie *Paecilomyces variotii*, caracterizado por grupos de conidióforos verticilados, onde as fiálides verticiladas apresentam uma base cilíndrica ou inflada que afunila e se estreita no pescoço, onde se formam os conídios. Os conídios tipicamente hialinos, unicelulares, com paredes lisas, produzidos em cadeia basipetal (BAINIER, 1907).

O gênero foi revisado por Samson em 1974, que dividiu o gênero em duas seções: Seção *Paecilomyces* e Seção *Isarioidea*, e todas as espécies entomopatogênicas foram agrupadas na última seção, enquanto *Paecilomyces variotii* e as outras espécies de *Paecilomyces* que apresentam estágios conidiais das espécies de *Byssochlamys* (Eurotiomycetes: Eurotiales) foram agrupados na seção *Paecilomyces* (D'ALESSANDRO et al., 2014).

Através de estudos filogenéticos das espécies de *Paecilomyces* seção *Isarioidea* usando os genes de rDNA de β -tubulina e ITS observou-se a existência de um grupo monofilético designado como clado *Isaria*, que incluiu as seguintes espécies: *I. amoenerosea*, *I. cateniannulatus*, *I. cateniobliquus*, *I. cicadae*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *I. ghanensis*, *I. javanica* e *I. tenuipes*. A revisão taxonômica de *Paecilomyces* seção *Isarioidea*, começou com a lectotipificação do status de *Isaria*, um gênero há muito tempo considerado sinônimo de *Paecilomyces*; mas baseado em novas evidências o gênero *Isaria* com *I. farinosa* como espécie-tipo foi oficialmente aceita (GAMS et al., 2005; HODGE et al., 2005; LUANGSA-ARD et al., 2005).

A classificação de Samson foi baseada em características morfológicas, mas muitas vezes foi altamente subjetivo e conduziu as identificações de forma ambígua ao nível da espécie (SAMSON, 1974; D'ALESSANDRO et al., 2014).

A espécie *Isaria javanica* (Friederichs; Bally) Samson & Hywell-Jones, pertence à ordem Hypocreales e a família Cordycipitaceae. *Isaria javanica* foi originalmente isolada de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolithidae) em Java, Indonésia (Samson, 1974) e atualmente é pouco encontrada na literatura (DUNLAP et al., 2017).

Estudos recentes relataram que muitas linhagens de *I. fumosorosea* isoladas como agentes de controle biológico de artrópodes são muitas vezes linhagens mal identificadas de *I. javanica* (CABANILLAS; JONES, 2013; D'ALESSANDRO et al., 2014; DUNLAP et al., 2017).

Este erro pode ser atribuído ao uso de chaves taxonômicas para diferenciar tamanho dos conídios e colorações das colônias de *I. fumosorosea* e *I. javanica*. A descrição inicial informa que *I. javanica* tem conídios mais longos (5-7,4 μ m) do

que *I. fumosorosea* (3-4,6 µm) em meio de cultivo ágar malte. No entanto, quando colonizam insetos, *I. javanica* têm conídios muito menores (3-3,5 µm) do que em ágar malte (DUNLAP et al., 2017).

Além disso, a morfologia macroscópica dessas espécies pode mudar com o meio de cultura usado para o seu crescimento. Essa ambiguidade e a falta de melhores chaves taxonômicas são a causa mais provável da confusão em torno dessas espécies. Houve vários estudos filogenéticos recentes que mostraram esse erro (CABANILLAS; JONES, 2013; D'ALESSANDRO et al., 2014; GALLOU et al., 2016, DUNLAP et al., 2017).

Na descrição macromorfológica das colônias de *I. javanica*, observa-se que crescem lentamente, na textura de pó com aspecto branco primeiramente, tornando-se de cor creme com a idade, em meio de cultura Sabouraud (CABANILLAS; JONES, 2013; D'ALESSANDRO et al., 2014).

Os conidióforos são eretos, decorrentes do micélio aéreo, com até 50 µm de comprimento, 1,5-2,5 µm de largura, ramos com filíades em espirais de 2 a 3 grupos. As filíades são constituídas por uma parte basal cilíndrica, que se afunila em um pescoço fino. Os conídios são fusiformes, às vezes cilíndricos, hialinos, de paredes lisas, 4,0-7,4 x 1,2-1,7 µm (LUANGSA-ARD et al., 2005).

Concluindo, as espécies *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. javanica* são cosmopolitas, facilmente isoladas de solos com ampla gama de hospedeiros de insetos principalmente das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera e apresentam potencial para o controle biológico de várias espécies de pragas de cultivo como soja, milho, algodão, morango e arroz (LIMA, 1989; ALVES, 1998; MEYLING; EILENBERG, 2007; ZIMMERMANN, 2007b; REHNER et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. **Manual de Culturas Hortícolas** -. Lisboa: Editorial Presença. v.2, 1^a ed., p. 195-219, 2006.

ALTIERI, M. **Agroecologia: A dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 4.ed., ed. da UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2ªed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

ANTUNES L. E. C.; CARVALHO G. L.; SANTOS, A. M. **A cultura do morango**— 2.ed. rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica,. 52 p. – 2011 (Coleção Plantar, 68)

ANTUNES LEC; DUARTE FILHO J. 2005. Importância do cultivo. In: **Sistema de produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>. Acessado em 21 de agosto de 2017.

ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. A cultura do Morango. **Coleção Plantar**. 2. Ed, n.68, 2011.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; VIGNOLO, G. K.; GONÇALVES, M. A. Morangos do jeito que o consumidor gosta. **Campo e Lavoura**, Anuário HF, n. 1, p.64-72, 2015.

BAINIER, G. Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. **Bulletin de la Société Mycologique de France**, v.23, p. 26–27,1907.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA; ZAWADNEAK, C. A. M. **Guia para a identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. **Biological Control**, v. 55, p. 7 - 16, 2009.

BOOMSMA, J.J., JENSEN, A.B., MEYLING, N.V., EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, v.59, p.467–485, 2014.

BOTTON, M; KOVALESKI, A; FERLA, J. N; PINENT, J. M. S. Controle de Pragas. **Produção de Morangos no Sistema Semi-Hidropônico**. Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de Produção, 15. Versão Eletrônica. Dez/2006.

CABANILLAS, H.E., JONES, W.A. Pathogenicity of *Isaria poprawskii* (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) against the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae), under laboratory conditions. **Crop Protection**, v. 50, p.46–52, 2013.

CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, v. 40, p.241–321, 2003.

CHARNLEY, A. K.; COLLINS, S. A. **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. 2.ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, p. 159-184, 2007.

D'ALESSANDRO, C.P.; JONES, L.R.; HUMBER, R.A.; LOPEZ-LASTRA, C.C.; SOSA-GOMEZ, D.R. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. **Journal of Basic Microbiology**, v.54, p.21–31, 2014.

DAROLT, M.R. Morango orgânico: opção sustentável para o setor. **Revista Campo e Negócios**, v.34, p.58-61, 2008.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, W.H.A. A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. **Mycological Research**, v.104, p.135–151, 2000.

DUNLAP, C.A.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; JACKSON, M.A. Rapid discrimination of *Isaria javanica* and *Isaria poprawskii* from *Isaria* spp. using high resolution DNA melting assays. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.150, p.88-93, 2017.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biological Control**, v. 46, p.387–400, 2001.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Production/ strawberry. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> E >. Acessado em: 28 de maio de 2017.

FACHINELLO, J.C. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.109-120, 2011.

FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, N.; ROBERTS, D. W. CTC medium: a novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v.54, p.197-205, 2010.

FUXA, J.R.; TANADA, Y. Epizootiology of insect diases. New York: **Wiley-interscience**, 1987.

GALLOU, A.; SERNA-DOMÍNGUEZ, M.G.; BERLANGA-PADILLA, A.M.; AYALAZERMEÑO, M.A.; MELLÍN- ROSAS, M.A.; MONTESINOS-MATÍAS, R.; ARREDONDO-BERNAL, H.C. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. **Fungal Biology**, v.120,p. 414–423, 2016.

GAMS, W.; HODGE, K.T.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P. Proposal to conserve the name *Isaria* (anamorphic fungi) with a conserved type. **Taxon**,v.52, p. 537, 2005.

GLARE, T. R.; MILNER, R. J.; BEATON, C. D. Variation in *Metarhizium* a genus of fungal pathogens attacking Orthoptera: Is phialide morphology a useful criterion? **Journal of Orthopteran Research**, v.5, p.19-27, 1996.

HAJEK, A. E.; DELALIBERA, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, v. 55, p. 147–158, 2010.

HAJEK, A.E.; LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293–322, 1994.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p.509–547, 2007.

HODGE, K.T.; GAMS, W.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P. Lectotypification status of *Isaria* Pers.:Fr. **Taxon**, v.52, p.485–489, 2005.

HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5260–5266, 2005.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, p. 23- 69, 2001.

KEANE, R.M.; CRAWLEY, M.J. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. **Trends in Ecology & Evolution**, v.17, p.164–170, 2002.

KELLER, S.; ZIMMERMANN, G.. Mycopathogens of soil insects. London (United Kingdom), **Academic Press**, p. 240–270, 1989

LIMA, E.A.L.A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, supl.3, p.17-20, 1989.

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

MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P.A.; BRIDGE, P.D.; RIBA, G. Genetic Diversity of *Beauveria bassiana* and Relatedness to Host Insect Range. **Mycological Research**, v.101, p.159-164, 1997.

MEDO, J.; CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, p. 200-208, 2011.

MESSING, R. H.; WRIGHT, M. G. Biological control of invasive species: solution or pollution. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.4, p.132–140, 2006.

MEYLING, N. V.; THORUP-KRISTENSEN, K.; EILINBERG, J. Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. **Biological Control**, v. 59, p. 180–186, 2011.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, p. 145-155, 2007.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agrosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.113, p. 336-341, 2006.

MIRANDA, F.; FERNANDES, T. D. **Manual de boas práticas: Morango. Porto:** ESB, UCP, 2001.

NONDILLO, A.; REDAELLI, L. R.; PINENT, S. M. J.; BOTTON, M. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae) em morangueiro. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 4, p. 679-683, 2009.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Ed. Manole, São Paulo, SP, 2002.

PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, v. 55, p.187–198, 2010.

QUESEDA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; MARANHÃO, E. A. A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, v. 111, p. 947- 966, 2007.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies Mycology**, v.6, p.1–119, 1974.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J.J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v.103, p.1055-1073, 2011.

STOCKS, S.D.; HODGES, A.A. **European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>), 2011

VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C.; RIBA, G. Genome Organization in *Beauveria bassiana* Electrophoretic Karyotype Gene Mapping and Telomere Fingerprinting. **Fungal Genetics and Biology**, v.20, p.175-183, 1996.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BORBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v. 114, p. 291-294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H.R.; SANTOS, B. Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). In: Evaldo Vilela; Roberto A. Zucchi. (Org.). **Pragas Introduzidas: Insetos e Ácaros**. 2ed.Piracicaba, SP: ESALQ/ FEALQ, v.01, p. 216-231, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C.; BOTTON, M.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; VIDAL, H. R. Pragas do morangueiro. In: Zawadneak, M. A. C; Schuber, J. M; Mógor; Atila, F. (Org.). **Como produzir morangos**. 1ed. Curitiba: Editora UFPR, v. 1 p. 101-145, 2014.

ZENG, Y. Genetic Characterization of *Beauveria bassiana* Associated with Fire Ants *Solenopsis* spp and other Insects. Dissertação de doutorado, University of Florida, Gainesville, FL, USA, 1999.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, p.553–596, 2007.

ZIMMERMANN, G. 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**, v.18, p.865–901,2008.

Capítulo

2

Isolamento e Seleção de Fungos Entomopatogênicos de Solos Agrícolas e Mata nativa

RESUMO

Fungos entomopatogênicos como *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* são amplamente distribuídos em ecossistemas terrestres em diferentes zonas climáticas. Vários estudos sugerem que as práticas agrícolas convencionais reduzem a diversidade natural e a abundância de fungos entomopatogênicos, o alto teor de matéria orgânica que frequentemente se encontra em solos de cultivo orgânico, estimula uma maior prevalência desses fungos em comparação com solos de cultivos convencionais enquanto outros estudos não observam diferenças entre solos de diferentes cultivos. Assim, este trabalho visou selecionar novas linhagens de fungos entomopatogênicos isolados a partir de solos de sistemas convencionais, orgânicos e solos de mata nativa. Foram coletadas 210 amostras de solo de cinco áreas distintas no município de Araucária, oito áreas no município de Morretes em uma unidade de conservação e duas áreas no município da Lapa, sendo uma delas agrícola e outra de mata nativa, no estado do Paraná. As amostras de solo foram diluídas em solução salina com cloranfenicol na concentração de 0,4g/L e uma alíquota de 100 µl foi dispensada em meio seletivo. As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 28±0,5°C por 21 dias no escuro. As colônias de interesse foram repicadas em Sabouraud e depois foram submetidas à identificação clássica em nível de gênero e em seguida o sequenciamento das regiões ITS e β-tubulina do DNA fúngico para a identificação das espécies. Foram contabilizadas 169 colônias de fungos entomopatogênicos pertencentes às espécies *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, *Isaria javanica* e *Lecanicillium* sp. O gênero *Beauveria* foi predominante, com frequência de 43,7%, seguido das espécies *P. lilacinum* com 23,86% e *M. anisopliae* com 23,16%, os demais gêneros juntos apresentaram frequência de 5,28%.

Palavras-chave: *Beauveria*; *Metarhizium*; isolamento; controle biológico.

1 INTRODUÇÃO

O solo fornece um habitat para uma diversidade de microrganismos, portanto é considerado um reservatório importante para uma diversidade de espécies entomopatogênicas. Tais fungos contribuem significativamente para a regulação das populações de insetos, especialmente em solos agrícolas sustentáveis, através do controle biológico (ALTIERI, 2004).

O isolamento de fungos entomopatogênicos oriundos de diferentes solos é essencial para conhecer a sua biodiversidade e para selecionar um conjunto de possíveis agentes de controle biológico a serem aplicados de forma inundativa em sistemas agrícolas para fins de controle de pragas (KLINGEN et al., 2002).

Muitas espécies entomopatogênicas pertencem à ordem Hypocreales (Ascomycota) e podem habitar o solo por uma parte significativa de seu ciclo de vida (MEYLING; EILENBERG, 2007).

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin é caracterizado como uma espécie "agrícola", enquanto que espécies do gênero *Isaria* spp. são raras em solos cultivados, mas são frequentemente encontradas em solos florestais e a espécie *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin pode ocupar uma ampla gama de habitats (MEYLING; EILENBERG, 2007).

A composição do solo e a quantidade água afetam a persistência e a ocorrência dos fungos entomopatogênicos. Solos arenosos favorecem a perda de conídios pela lixiviação (QUESADA-MORAGA et al., 2007), enquanto que solos com maiores teores de silte e argila favorecem a manutenção destes entomopatógenos devido à adsorbância dos conídios nas partículas de argila (INGLIS et al. 2001).

Em relação à diversidade de fungos entomopatogênicos em sistemas agrícolas convencionais e orgânicos, muitos trabalhos divergem quanto aos resultados (KLINGEN et al., 2002; HAUKELAND, 2006; JABBOUR; BARBERCHECK, 2009; MEYLING et al., 2011; SHIN et al., 2013; TKACZUK et al., 2014).

Meyling et al. (2011) não observaram diferença entre as comunidades de fungos entomopatogênicos presentes no solo de sistemas convencional e orgânico em comparação ao orgânico enquanto que o estudo feito por Klingen et al. (2002) observaram maior ocorrência de fungos entomopatogênicos em solos de cultivo orgânico.

Porém essa comparação bilateral não é suficiente para inferir sobre a diversidade de fungos entomopatogênicos de solos agrícolas orgânicos e convencionais, já que diversos fatores como a localização geográfica, clima, habitat, altitude, pH do solo, quantidade de matéria orgânica impactam a presença das espécies fúngicas e a resposta de cada espécie a estas condições (QUESEDA-MORAGA et al., 2007; MEDO; CAGÁN, 2011).

O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar espécies de fungos entomopatogênicos a partir de solos agrícolas orgânicos e convencionais e de mata nativa, visando obter isolados com potencial entomopatogênico para o controle biológico de pragas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de solo

As coletas de solo ocorreram entre fevereiro e junho de 2015 acompanhadas pela equipe da EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural) na Região de Araucária e a equipe da Produção integrada do Morango (PIMO) nas regiões da Lapa, Antonio Olinto e Morretes no estado do Paraná.

As amostras de solo foram coletadas em pontos aleatórios das extremidades, meio e centro de cada área (TABELA 1). Foram amostrados regiões de 0 a 10 cm do solo com o auxílio de uma espátula (DIONÍSIO et al., 2016).

TABELA 1- RELAÇÃO DAS LOCALIDADES DE COLETA AMOSTRAS DE SOLOS REALIZADAS NO ESTADO DO PARANÁ.

Região	Localidade	Quantidade de amostras	Origem do solo	Coordenadas
Araucária	Lagoa Suja	40	Mata adjacente a cultivo convencional de milho	S 25°53'190" W 49°43'195"
Araucária	Guajuvira	20	Cultivo convencional de morango	S 25°53'376" W 49°44'654"
Lapa	Lapinha	30	Cultivo orgânico de morango	S 25°74'010" W 49°89'425"
Antonio Olinto	Água Amarela	20	Mata nativa	S 25°90'140" W 50°10'702"
Morretes	São João da Graciosa	50	Bananeiras de mata nativa	S 25°38'776" W 48°86'026"
Morretes	Estrada da Graciosa	50	Mata nativa*	S 25°34'154" W 48°90'083"

*RESERVA DA BIOSFERA DA MATA ATLÂNTICA – ESTRADA DA GRACIOSA

Os solos foram colocados em sacos plásticos de 500 mL com fechos herméticos e refrigerados em caixa de isopor com gelo e armazenados em refrigerador a -10° C para isolamento de colônias fúngicas entomopatogênicas.

2.2 Isolamento e cultivo dos fungos

Para o isolamento dos fungos foi utilizado o meio de cultivo Niger, composto de 100 g de extrato de semente de Niger, 1 g de glicose e 18 g de ágar para 1000 mL de água destilada, acrescido de 0.5 mL de 0.6 g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 0.5 mL de 0.05 g/mL de tetraciclina (Sigma-Aldrich, Steinheim), 0.5 mL de 0.1 g/mL de dodine (Sigma-Aldrich) e 2.5 mL de 0.05 g/mL de ciclohexamida (Sigma-Aldrich). Este meio foi modificado de acordo com Strasser *et. al.* (1996).

Em cada área foram coletadas de 10g de amostras de solo, sendo 1g diluído em 100 mL de água com 0,01% de Tween 80 (Merck) e 0,4 g/L de cloranfenicol (Sigma®).

As amostras foram agitadas durante 5 minutos em agitador magnético e permaneceram em repouso por 30 minutos. Em seguida, 100µL da suspensão de

cada amostra de solo foram espalhadas nas placas, com a alça de Drigalski e incubadas em estufa BOD a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ por 14 dias.

As colônias com características de gêneros de fungos entomopatogênicos como *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Lecanicillium* sp. e *Isaria* sp. foram repicadas em meio Niger e incubadas em estufa BOD a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ por 7 dias.

2.3 Identificação das colônias fúngicas

2.3.1 Identificação macromorfológica e micromorfológica

Os isolados foram separados conforme a morfologia das colônias e para cada uma foi realizada a técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999). A leitura das lâminas foi realizada no sétimo e décimo quarto dia após a incubação das placas de microcultivo.

A classificação em nível de gênero foi realizada através de observações de corpos de frutificação ao microscópio óptico, aumento de 400 vezes e da utilização de literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1987; KERN, 1988). Os fungos identificados foram depositados na Coleção Microbiológica indexada na *Taxonline/* Rede Paranaense de Coleções Biológicas.

2.3.1.1 Microcultivo

Para esta técnica (KERN; BLEVINS, 1999) foram utilizadas placas de Petri 9×15 cm esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina de microscopia e um pedaço de algodão. Dois cubos (1cm x 1cm) de meio de cultura Niger foram cortados e inseridos sobre as extremidades de uma lâmina contida no interior da placa de microcultivo. O fungo foi repicado nas quatro extremidades de cada cubo e posteriormente esses foram cobertos por uma lamínula esterilizada.

O algodão no interior da placa de microcultivo foi umedecido com água destilada esterilizada. As placas de microcultivo foram incubadas em estufa BOD por um período de 7 a 14 dias a $28 \pm 1^\circ \text{C}$.

As lamínulas foram retiradas e colocadas sobre uma lâmina contendo uma gota do corante Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes.

2.3.2 Identificação molecular

2.3.2.1 Extração de DNA

As colônias foram cultivadas em meio Sabouraud, à $28\pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias. Em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL contendo sílica e celite (2:1) foi colocado parte das culturas (1cm× 1cm) e adicionado 300 μL brometo de cetilmetilamônia (CTAB) e a cultura foi macerada com auxílio de maceradores de vidro autoclavados.

Em seguida, foi adicionado mais 200 μL de CTAB e misturado em um agitador de tubos por 1 minuto. Cada amostra foi incubada em banho-maria por 10 minutos à 65°C . Posteriormente foi adicionado 500 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e centrifugado por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, sendo repetida a adição de 500 μL de CIA e centrifugação por 7 minutos a 12000 rpm (BADALI et. al., 2009).

A precipitação do DNA foi feita com a transferência do sobrenadante para outro eppendorf onde foi adicionado 2 volumes de etanol 96% gelado e guardado no freezer (-20°C) por 24 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas por 7 minutos a 12000 rpm e os sobrenadantes descartados cuidadosamente (etanol).

O pellet de DNA foi lavado com 500 μL de etanol 70% gelado e centrifugado novamente por 7 minutos a 12000 rpm. Logo após, o sobrenadante (etanol) foi retirado para a desidratação do DNA a $45\pm 1^\circ\text{C}$ por 60 minutos e depois ressuspenso em 100 μL de água milliQ permanecendo 24 horas em temperatura ambiente para depois ser reservado em freezer -20°C .

O DNA foi quantificado através do NanoDrop 1000 (Spectrophotometer Thermo Scientific) e os fragmentos visualizados em gel de agarose 0,8%, corados com GelRed[®] sob transiluminador U.V. e fotodocumentados.

2.3.2.2 Amplificação de regiões do genoma fúngico

A reação de PCR foi realizada com 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores diferentes, universais para fungos (TABELA 2), ITS1 e ITS4, que amplificam a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e Bt2a e Bt2b que amplificam a região responsável pela síntese de β -tubulina.

A amplificação para as amostras seguiu as condições: 40ng de DNA extraído, tampão da reação 1X, 0,02 U/ μ L de Taq polimerase, 0,8 μ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2mM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂ em um volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada com a desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C.

TABELA 2- SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES GENÔMICAS DO DNA FÚNGICO.

Primers	Sequências	Referências
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	WHITE et al. (1990)
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	WHITE et al. (1990)
Bt2a	5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3'	GLASS; DONALDSON (1995)
Bt2b	5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3'	GLASS; DONALDSON (1995)

2.3.2.3 Purificação do DNA e reação de sequenciamento

Aos produtos da amplificação da PCR, foram acrescentados 2/3 de acetato de amônio (AcNH₄) 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 96%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm.

Os pellets resultantes foram lavados com etanol 70%, e ressuspendidos em 5 µl de água ultrapura. Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1 µl, foi aplicado em gel de agarose 1,5%.

O sequenciamento das regiões do DNA fúngico foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger et al. (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA. As reações de sequenciamento consistem de 1 a 3 µL do produto de PCR purificado, 0,5 µL de Buffer; 0,5 µL de cada *primer*, 0,5 µL do Big-Dye, completando-se para um volume final de 10 µL com água ultra pura.

As condições de amplificação que foram utilizadas: 96°C por 1 minuto, e por 35 ciclos a 96°C por 10s, 50°C por 5 segundos e por 60°C por 4 minutos. As amostras foram sequenciadas em sequenciador ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

2.3.2.4 Edição e análise das sequências

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 e pelo programa MEGA versão 4.0 para comparação com outras sequências existentes no banco de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et. al.*, 1997) permitindo a detecção de similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes.

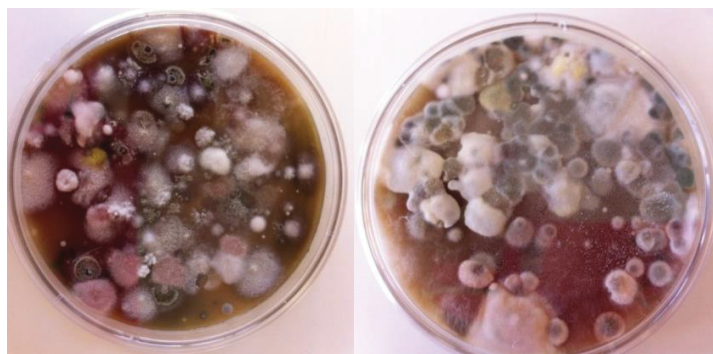
Após a edição das sequências, todas foram depositadas no banco de dados *GenBank*.

3 RESULTADOS

Foram coletadas 210 amostras de solos de seis localidades diferentes, sendo elas áreas de cultivos convencionais, orgânicos e áreas de mata nativa, dentre as amostras de solos contabilizou-se 169 colônias (FIGURA 1) de fungos entomopatogênicos que pertencem às espécies entomopatogênicas *Beauveria*

bassiana, *Beauveria caledonica*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, *Isaria javanica*, *Lecanicillium* sp.

FIGURA 1- AMOSTRAS DE COLÔNIAS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO SOLO.



FONTE: O autor (2018).

A espécie *Beauveria bassiana* foi predominante, com frequência de 43.7% de fungos isolados, seguido do gênero *Purpureocillium lilacinum* com 23.86% e *Metarhizium anisopliae* com 23.16%, o gênero *Lecanicillium* sp. apresentou uma frequência de aproximadamente 7% e as espécies *B. caledonica* e *I. javanica* juntas apresentaram baixa frequência de menos de 2%, sendo bem inferior em relação às demais espécies (TABELA 3).

Em nosso estudo, através do método de isolamento por meio de cultivo seletivo, foi possível isolar de todos os solos amostrados a espécie *P. lilacinum*, enquanto que a frequência de isolamento (TABELA 3) da espécie *B. bassiana* foi isolada de amostras de solos adjacentes a cultivos convencionais de milho e de solos de cultivos convencionais de morango na região de Araucária-PR.

Nas amostras de solos próximos a bananeiras nativas espalhadas na mata, foram isoladas as espécies *B. caledonica* e *M. anisopliae*, e esta última também foi encontrada nas amostras de solos de mata nativa. Nos solos de cultivo orgânico de morango na região da Lapa-PR foi isolado o gênero *Lecanicillium* sp. e este também foi isolado junto com a espécie *I. javanica* de solos de mata nativa na região de Morretes-PR.

TABELA 3. FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO (%) DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE SOLOS DE MATA E DE SISTEMAS DE CULTIVOS.

Espécies*	Mata adjacente ao cultivo de milho	Cultivo convencional de morango	Cultivo orgânico de morango	Bananeiras	Reserva Ambiental*	Total
<i>B. bassiana</i>	41.72	1.98	-	-	-	43.70
<i>B. caledonica</i>	-	-	-	1.32	-	1.32
<i>M. anisopliae</i>	-	-	-	14.56	8.60	23.16
<i>Lecanicillium</i> spp.	-	-	3.97	-	3.30	7.27
<i>P. lilacinum</i>	5.29	4.63	3.31	5.96	4.63	23.82
<i>I. javanica</i>	-	-	-	-	0.66	0.66

*RESERVA DA BIOSFERA DA MATA ATLÂNTICA – ESTRADA DA GRACIOSA

DISCUSSÃO

Os solos amostrados neste trabalho pertencem a diferentes ambientes que sofreram alterações antrópicas com mais ou menos intensidade. As condições do solo e os fatores bióticos e abióticos são variáveis e refletem na distribuição e abundância de fungos entomopatogênicos como *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* (BRUCK et al. 2010).

Vários estudos sugerem que as práticas agrícolas convencionais reduzem a diversidade e abundância de fungos entomopatogênicos (KLINGEN et al., 2002; Tkaczuk et al., 2014). Isso pode ser apoiado por estudos que demonstram a ação negativa de agroquímicos sobre os fungos entomopatogênicos (KLINGEN; HAUKELAND, 2006). Além disso, sugere-se que o alto conteúdo de matéria orgânica que muitas vezes é encontrado em solos orgânicos, estimula uma maior prevalência de espécies entomopatogênicas em comparação com solos controlados convencionalmente (SHIN et al., 2013). Outros estudos, no entanto, relatam que não há diferença na prevalência de fungos entomopatogênicos entre solos de cultivos orgânicos e convencionais (JABBOUR; BARBERCHECK, 2009; MEYLING et al., 2011).

Metarhizium e *Beauveria* são os gêneros entomopatogênicos mais comuns em habitats agrícolas e florestais (GOTTWALD; TEDDERS, 1984; MEYLING; EILENBERG, 2006). Nossos resultados mostram a maior frequência de *B. bassiana* em amostras de solos agrícolas, em outros estudos é possível observar a sua alta frequência de isolamento em cultivos orgânicos e convencionais (GARRIDO-JURADO et al., 2015). No entanto *B. caledonica* foi isolada de amostras de solos de bananeiras presentes em matas. *M. anisopliae* não foi observado nas amostras de solos cultivados.

Beauveria bassiana mostra ser mais frequente em estudos de isolamento de solo em relação a *M. anisopliae* e outras espécies como *P. lilacinum*, *Lecanicillium* spp. e *Isaria* spp. (MEDO et al., 2011; LOPES et al., 2013). Em nosso estudo também foi observado uma maior frequência de isolamento de *Beauveria* em relação a *M. anisopliae*, *P. lilacinum*, *Lecanicillium* e *Isaria javanica*.

No presente trabalho a maior parte de indivíduos de *B. bassiana* foram provenientes de amostras de solos das matas adjacentes ao cultivo convencional de milho. Entretanto *Metarhizium anisopliae* apresentou isolados que pertencem a solos de mata associada a bananeiras e de ambiente florestal. Pérez-González et al. (2014) obteve resultados semelhantes aos do nosso estudo, onde a maior frequência de *B. bassiana* foi proveniente de vários cultivos, principalmente milho e outras áreas não cultivadas e uma menor frequência de isolamento de *M. anisopliae* obtidas de áreas não cultivadas.

No presente trabalho através do isolamento por meio de cultivo, foi possível isolar várias espécies de fungos entomopatogênicos de áreas de cultivo orgânico, convencional e mata nativa, porém em proporções diferentes, e isto pode ser devido a fatores como, clima, luz, umidade, características do solo, vegetação, tipos de cultivos, aplicação de pesticidas e fertilizantes inorgânicos e habitats com poucos distúrbios podem provir condições favoráveis para manutenção da população de fungos entomopatogênicos (KLINGEN et al., 2002)

REFERÊNCIAS

ALTIERI, M. **Agroecologia: A dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 4.ed., ed. da UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

BADALI, H.; CARVALHO, V. O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; WIATKOWSKI, I. B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 47, p. 55-66, 2009.

BARNETT, H. C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987.

BRUCK, D.J. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. **Biological Control**, v.55, n.1, p.103-112, 2010.

GARRIDO-JURADO, I.; FERNANDEZ-BRAVO, M.; CAMPOS, C.; QUESADA-MORAGA, E. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.130, p.97-106, 2015.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GOTTWALD, T.R.; TEDDERS, W.L. Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. **Environmental Entomology**, v.13, p. 557–560, 1984.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, p.23- 69, 2001.

JABBOUR, R.; BARBERCHECK, M.E. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. **Biological Control**, v.51, 435-443, 2009.

KERN, M. E. **Medical mycology: A self- instructional text**. 3 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1988.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2 ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KLINGEN, I.; EILENBERG J, MEADOW R. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.91, p. 191–198, 2002.

KLINGEN, I.; HAUKELAND, S. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg, J and Hokkanen, H.M.T (Eds.), **An ecological and societal approach to biological control. Series: Progress in biological control**, v.2 Springer, p.145-211, 2006.

LOPES R.B.; MESQUITA, A.L.M.; TIGANO, D.A.; SOUZA, M.S.; MARTINS, I.; FARIA, M. Diversity of indigenous *Beauveria* and *Metarhizium* spp. in a

commercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, v.6, p.356-364, 2013.

MEDO, J.; CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, p. 200-208, 2011.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, p. 145-155, 2007.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agrosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.113, p. 336-341, 2006.

MEYLING, N. V.; THORUP-KRISTENSEN, K.; EILINBERG, J. Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. **Biological Control**, v. 59, p. 180–186, 2011.

PÉREZ-GONZÁLEZ, V.H.; GUZMÁN-FRANCO, A.W.; ALATORRE-ROSAS, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A.; CARRILLO-BENÍTEZ, M.G.; BAVERSTOCK, JASON. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 54-61, 2014.

QUESEDA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; MARANHÃO, E.A.A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, v.111, p.947- 966, 2007.

SHIN, T.Y.; LEE, W.W.; SEUNG, H.K.; CHOI, J.B.; BAE, S.M.; CHOI, J.Y.; BAE, S.M.; CHOI, J.Y.; LEE, K.S.; JE, Y.H.; JIN, B.R.; WOO, S.D. Distribution and characterisation of entomopathogenic fungi from Korean soils. **Biological control Science Technology**, v.23, p.288-304, 2013.

STRASSER, H.; FORER, A.; SCHINNER, F. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. **AgResearch**, Lincoln, New Zealand, p 125–130, 1996.

TKACZUK, C.; KRÓL, A.; MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A.; NICEWICZ, Ł. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. **Journal of Ecological Engineering**, v.15, p.137-144, 2014.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Apud **Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, p. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.

Capítulo

3

**Avaliação da Mortalidade de
Larvas de 3^o ínstar de *Duponchelia
fovealis* em Condições de
Laboratório e Casa de Vegetação**

RESUMO

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidoptera: Crambidae), é uma nova praga da cultura de morangos no Brasil. O controle químico não é suficiente para diminuir a população desta praga por causa da natureza críptica das larvas que dificultam a ação do inseticida. O controle microbiano é uma alternativa eficaz para reduzir as aplicações massivas de pesticidas. Os fungos entomopatogênicos são comuns em ambientes terrestres, especialmente no solo, e são importantes reguladores naturais das populações de insetos através da infecção por ação de contato. O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade e a virulência de fungos entomopatogênicos isolados do solo contra *D. fovealis* em laboratório e em casa de vegetação para encontrar alternativas para o manejo desta praga. Foram testados 20 isolados de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica*, *Isaria javanica* e *Lecanicillium* sp. contra larvas de *D. fovealis* de 3º ínstar na concentração de 10^9 conídios/mL. A concentração letal (CL₅₀) e o tempo letal (TL₅₀) dos isolados mais patogênicos foram avaliadas. Em casa de vegetação a CL₅₀ e o LT₅₀ dos isolados mais virulentos foram determinadas. Os isolados de *B. bassiana*, Bea1, Bea111, *B. caledonica*, Bea110 e *I. javanica*, Isa340 foram os mais patogênicos contra *D. fovealis*, com média de mortalidade de 48, 57, 88 e 89%, respectivamente. Os isolados mais virulentos foram Bea111 e Isa340, com valores de CL₅₀ de $2,33 \times 10^6$ e $9,69 \times 10^5$ conídios/mL e TL₅₀ de 7,2 e 6,4 dias, respectivamente. Em condições de casa de vegetação a mortalidade das larvas de *D. fovealis* contra isolados Isa340 e Bea111 foi de 45 e 52 %. Estes resultados sugerem que *B. bassiana* e *I. javanica* possuem alto potencial como agentes de biocontrole. Esta é a primeira vez que os fungos entomopatogênicos isolados do solo foram testados contra *D. fovealis*.

Palavras-chave: Lagarta da Coroa; Morangueiro; praga; Fungos Entomopatogênicos; Controle Biológico

1 INTRODUÇÃO

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga invasiva e se tornou uma das mais destrutivas de colheitas de morango em Portugal, (FRANCO; BAPTISTA, 2010), Itália (BONSIGNORE; VACANTE, 2009), Turquia (EFIL et al., 2011) e Brasil (ZAWADNEAK et al., 2016). As larvas causam danos econômicos alimentando-se de folhas, flores e a coroa da planta, resultando no murchamento, colapso e morte das plantas e conseqüentemente reduzindo qualidade e rendimentos. Os hábitos crípticos das larvas tornam o controle químico difícil, diminuindo sua eficácia (CABI, 2016; STOCKS; HODGES, 2011; ZAWADNEAK et al., 2016) gerando a necessidade de buscar métodos alternativos de controle (ZAWADNEAK et al., 2016).

Assim, o controle biológico pode fornecer uma maneira alternativa de manejo (STOCKS; HODGES, 2011; ZAWADNEAK et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017) ainda pouco explorado no controle de *D. fovealis*. Neste contexto os fungos entomopatogênicos (EPF) possuem atributos que os tornam fortes candidatos ao controle biológico desta praga (AMATUZZI et al., 2018). Os EPF são comuns em ambientes terrestres, especialmente no solo, e são importantes reguladores naturais das populações de insetos através da infecção por contato, aumentando o potencial de epizootias e taxas de mortalidade na população de pragas (HAJEK; DELALIBERA, 2010). Os fungos dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* são amplamente reconhecidos como agentes promissores de controle biológico (MCCOY, 1990; ROBERTS; ST. LEGER, 2004) e são seguros para os agricultores, consumidores e meio ambiente (ALVES et al., 2008; BONSIGNORE; VACANTE, 2009; ORTIZ-URQUIZA, 2014, LACEY et al., 2016).

A lagarta da coroa é uma praga recente nos cultivos de morango, por este motivo há poucos estudos sobre métodos de controle alternativo ao controle químico. Portanto a avaliação de métodos preventivos através do manejo integrado de pragas pode ser usada como alternativa ao controle químico de *D. fovealis*. Com base nesse conhecimento, este estudo contribui com testes de fungos entomopatogênicos isolados de solos de mata nativa e dos sistemas de

cultivo contra larvas de *D. fovealis* em condições laboratoriais e de casa de vegetação para avaliar seu potencial no controle desta praga.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia- LabMicro na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil (TABELA 1).

A criação de *D. fovealis* foi estabelecida a partir de larvas coletadas em plantios de morangueiro (25°37'S, 49°04'E). Em laboratório foram mantidos em dieta artificial desenvolvida para *D. fovealis* em condições controladas (25 ± 2°C, UR: 60 ± 10%, fotofase de 12h) (ZAWADNEAK et al., 2017).

TABELA 1. RELAÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS CONTRA LARVAS DE *D. fovealis*.

Espécies	Isolados	GenBank
<i>Beauveria bassiana</i>	Bea1	KY471648
	Bea2	KY471649
	Bea3	KY471650
	Bea4	KY471651
	Bea5	KY471652
<i>Beauveria caledonica</i>	Bea111	KY471655
	A2B	KY471653
	Bea110	KY471654
<i>Lecanicillium</i> sp.	In1	KY471666
	104	KY471656
	107	KY471657
	110B	KY471658
	110C	KY471659
	110D	KY471660
	315	KY471661
<i>Metarhizium anisopliae</i>	381	KY471662
	399 ^a	KY471663
	399B	KY471664
	399C	KY471665
	Isa340	KY488507

Fonte: O autor (2018).

2.1 Bioensaio de Patogenicidade

Folhas de morango foram lavadas, e seus pecíolos foram envolvidos em algodão e colocados em um tubo de vidro de 20 mL com água destilada esterilizada em caixas de acrílico (11 × 11 × 3,5 cm). Os 20 tratamentos (TABELA 1) foram realizado em 5 repetições. Vinte e quatro larvas de terceiro ínstar de *D. fovealis* foram transferidas para cada caixa, de modo que cada caixa foi considerada uma repetição, totalizando 120 larvas testadas por tratamento. Foi pulverizado 1 mL da suspensão de conídios na concentração de 10^9 conídios/mL com Tween[®]80 a 0,3% sobre as folhas e larvas com auxílio do pulverizador Sagyma SW776 (10 PSI). O tratamento controle recebeu 1 mL de água destilada estéril com 0,3% de Tween[®]80. Após a pulverização, as caixas foram mantidas sob condições controladas ($25 \pm 2^\circ$ C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas). A mortalidade foi avaliada após sete dias. Indivíduos moribundos ou aqueles que não responderam ao toque do pincel foram considerados mortos e transferidos para placas de Petri com papel de filtro umedecido até a extrusão fúngica para verificação da esporulação *post mortem*. O experimento foi realizado por 5 semanas(QUESADA-MORAGA, 2006, com adaptações).

2.3 Bioensaio de virulência

Na segunda etapa de bioensaios de mortalidade, as linhagens de fungos que causaram maior mortalidade contra larvas de 3º ínstar de *D. fovealis* foram selecionadas para estimativa da linha básica de suscetibilidade, visando obter diferentes concentrações letais (CL) entre os fungos para emprego destes em ensaios em condições de casa de vegetação.

Para este bioensaio foram utilizadas cinco concentrações intercaladas: $1,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. Cada uma foi avaliada em caixa plástica gerbox contendo uma folha composta de morangueiro, onde foram transferidas as larvas com auxílio de um pincel ponta fina nº2.

Para cada concentração de esporos foram utilizadas 24 larvas em 5 repetições. Como padrão comparativo foi empregado bioinseticida comercial tendo como princípio ativo *Beauveria bassiana*, linhagem CG716 (Bovemax[®]).

Para isso 1 mL de cada suspensão de conídios foi pulverizada sobre as larvas com o auxílio de um aerógrafo SAGYMA[®] a 10 PSI. Após as pulverizações as gerbox foram incubadas em estufa BOD a 25±1°C, com fotofase de 14 horas e umidade relativa de 60±10% por sete dias.

As avaliações de mortalidade foram realizadas adotando o mesmo critério reportado anteriormente. Os indivíduos mortos foram retirados e colocados em placa de petri para exteriorização do fungo.

2.4 Testes de eficiência dos fungos entomopatogênicos em casa de vegetação

Os fungos que apresentaram a menor CL₅₀ (entre 10⁵ e 10⁶ conídios/mL) nos bioensaios em laboratório foram selecionados para o bioensaio em casa de vegetação. Mudanças de morango com três meses de idade saudáveis do cultivar "Albion" foram transferidas para recipientes de 500 mL com a mistura do substrato Plantmax[®].

As plantas foram mantidas sob luz natural e regadas duas vezes ao dia. Durante o ensaio, as temperaturas mínima e máxima foram registradas diariamente com um termômetro digital (Incoterme). Cada tratamento fúngico foi testado em 20 mudas.

As mudas foram infestadas com 10 larvas de terceiro ínstar de *D. fovealis* e cobertas por tecido voil e isoladas por um disco plástico laminado transparente (30cm) cobrindo toda a superfície do vaso com uma pequena abertura central para o caule da planta, a fim de evitar que os insetos escapassem pelo solo.

As folhas das plantas foram pulverizadas com 33 mL de suspensão fúngica dos isolados selecionados usando um pulverizador de precisão de CO₂ (Teejet XR11008VS).

Esse volume corresponde a 200 L.ha⁻¹, com uma densidade de 60.000 plantas, conforme recomendado pelos fabricantes da maioria dos biopesticidas comerciais.

O controle foi pulverizado com água destilada esterilizada contendo Tween[®] 80 a 0,3%. A pulverização foi realizada de baixo para cima para garantir a cobertura de toda a superfície da planta. A mortalidade foi avaliada após sete dias.

2.5 Análise estatística

O delineamento experimental de todos os experimentos foram inteiramente casualizados. No teste de patogenicidade, as taxas médias de mortalidade (%) foram usadas para calcular a eficiência fúngica de acordo com a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925) e os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey (P <0,05).

A Estimativa da CL₅₀ e TL₅₀ foram calculadas por análise de Probit usando o software PoloPlus (LeOra, 2002). Para o bioensaio em casa de vegetação, o número médio de insetos por planta de morangueiro foi analisado com ANOVA e teste de Tukey (P <0,05).

Quando as diferenças foram significativas em comparação com o grupo controle, a eficácia foi calculada de acordo com a fórmula de Henderson e Tilton (1955).

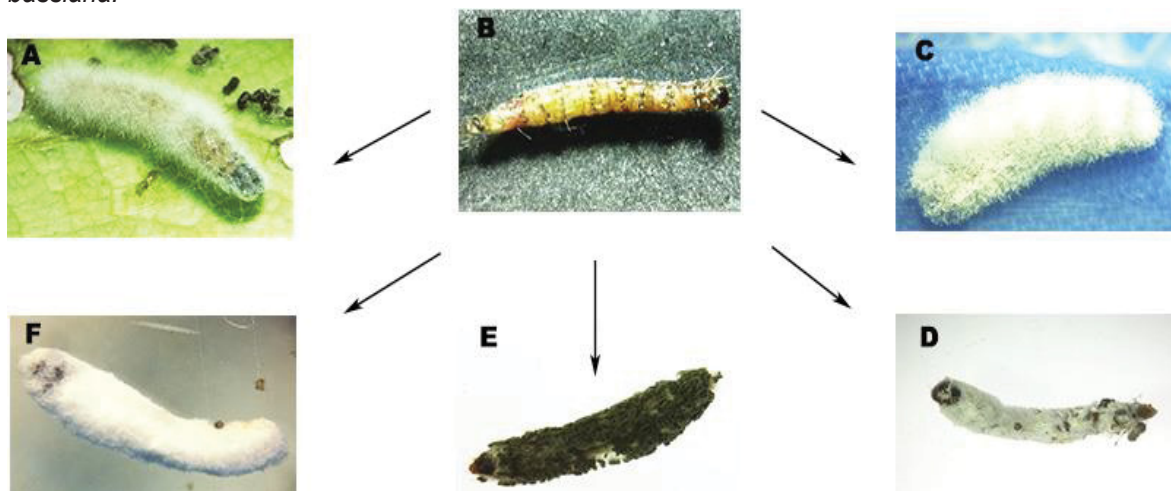
3 RESULTADOS

3.1 Bioensaio de patogenicidade

A patogenicidade de 20 isolados fúngicos de diferentes solos de cultivos e matas apresentou uma variação na mortalidade larvas de *D. fovealis* utilizadas neste experimento.

A extrusão dos fungos foi observada em todas as larvas com diferença no crescimento micelial ao final dos sete dias de incubação, porém algumas larvas já apresentavam micélio extrusado a partir das larvas mortas depositadas nas folhas no momento da leitura dos dados (FIGURA 1).

FIGURA 1- EXTRUSÃO DOS FUNGOS DAS LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE *D. fovealis* MORTAS. A. *Lecanicillium* sp.; B. Lagarta morta; C. *I. javanica*. D. *B. caledonica*; E. Fungo *M. anisopliae*; F. *B. bassiana*.



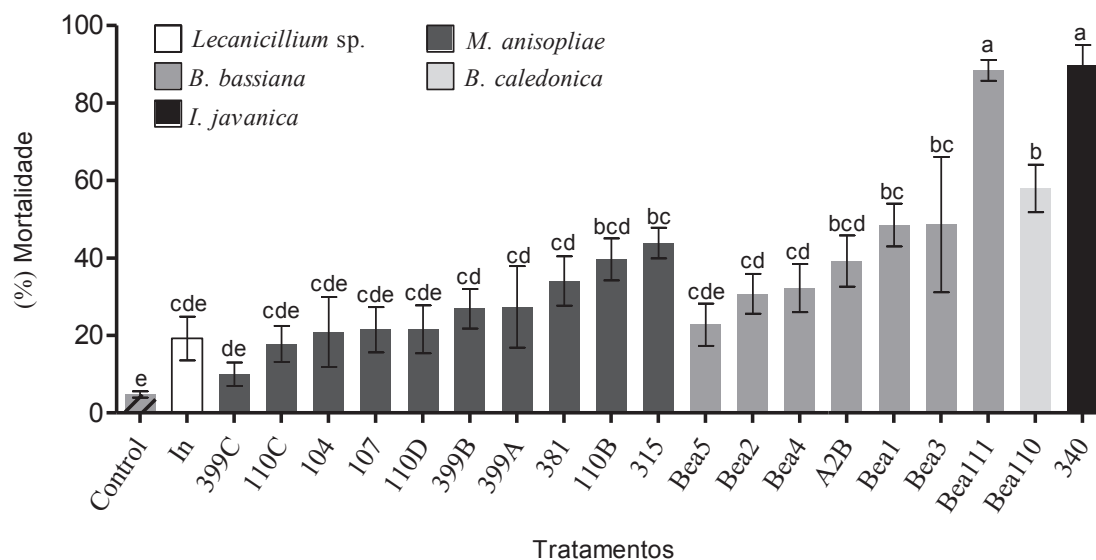
FONTE: O autor (2018).

A mortalidade de larvas de *D. fovealis* variou entre 10 e 89% (FIGURA 2). Dos 20 fungos testados, seis isolados causaram mortalidade significativa comparado com o tratamento controle (4,76%) ($F_{20,84} = 10.438$ $P < 0,01$ para 10^9 conídios/mL).

Os tratamentos com os fungos Bea1 (*B. bassiana*), Bea111 (*B. bassiana*), Bea110 (*B. caledonica*) e Isa340 (*I. javanica*) obtiveram respectivamente as melhores médias de mortalidade entre 48 e 89%, enquanto os isolados Bea1, Bea2, Bea3, Bea4 e A2B (*B. bassiana*), 381,110B e 315 (*M. anisopliae*) apresentaram médias entre 30 e 45%.

Os isolados 399C, 110C, 110D, 104, 107, 399B, 399A (*M. anisopliae*), In1 (*Lecanicillium* sp) e Bea5 (*B. bassiana*) revelaram-se pouco patogênicos, com mortalidade menor que 30%.

FIGURA 2- MÉDIA MORTALIDADE DAS LARVAS FRENTE AOS ISOLADOS ENTOMOPATOGÊNICOS. ANOVA ONE-WAY E TESTE DE TUKEY. ($F_{4,20}=10,44$ $P < 0,01$).



A extrusão dos fungos foi observada em todas as larvas com diferença no crescimento micelial (mais ou menos abundante) entre os tratamentos ao final dos sete dias de incubação. Dois agrupamentos de isolados podem ser distinguidos: o primeiro grupo dos isolados menos virulentos (< 40% de mortalidade), um segundo grupo com isolados mais virulentos (>40% de mortalidade).

Os isolados mais patogênicos contra larvas de 3º instar foram o Bea111 e Isa340, que causaram 88.45 e 89.75% respectivamente e o menos patogênico foi o isolado 399C da espécie *M. anisopliae* com 10% de mortalidade.

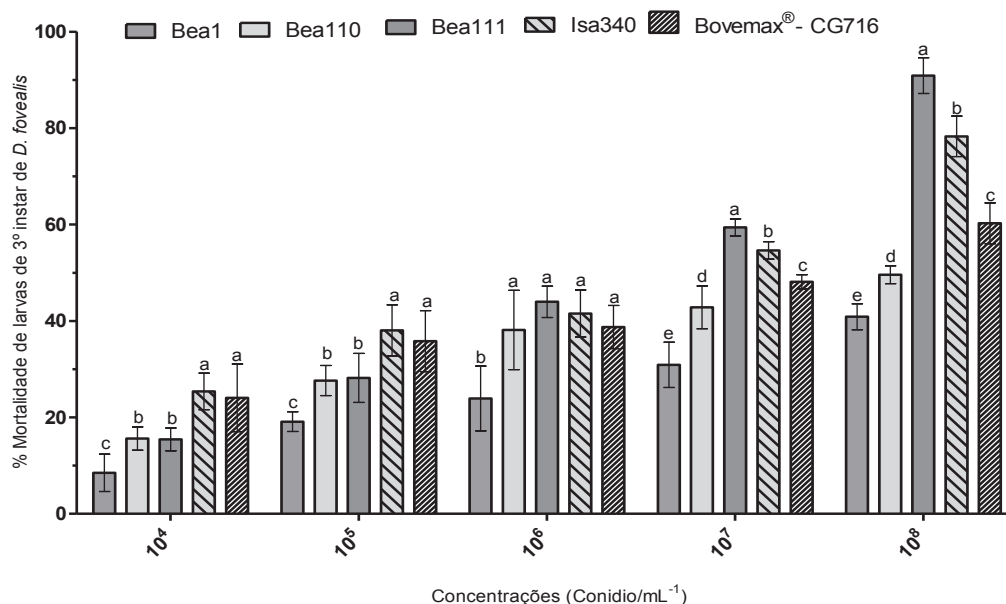
3.2 Bioensaio de virulência

A maior porcentagem de mortalidade (FIGURA 3) na concentração mais elevada (10^8 conídios/mL) foi de 91% (Bea111) 83% (Isa340), 49% (Bea111) e 40.76% (Bea1) e para a linhagem comercial 60%(CG716).

A proporção de insetos infectados aumentou com as concentrações de conídios testadas em larvas de *D. fovealis*. Houve mortalidade significativa das larvas entre os isolados em cada concentração, 10^4 ($F_{4,24} = 20,77$ $P = 0,001$), 10^5

($F_{4,24} = 20,11$ $P = 0,001$), 10^6 ($F_{4,24} = 5,40$ $P = 0,004$), 10^7 ($F_{4,24} = 96,39$ $P < 0,001$), 10^8 ($F_{4,24} = 269,96$ $P < 0,001$), entretanto em cada concentração não são observados os mesmos efeitos para cada isolado fúngico testado (Figura 3). Diferenças significativas na mortalidade entre os isolados de *B. bassiana* Bea111 e *I. javanica* Isa340 foram encontradas nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios/mL.

FIGURA 3- PORCENTAGEM DE LARVAS DE *Duponchelia fovealis* INFECTADAS APÓS A INOCULAÇÃO COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE CONÍDIOS DIFERENTES DE ISOLADOS DE TRÊS ESPÉCIES DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS. DOIS ISOLADOS DE *B. bassiana* Bea1 e Bea111, UM ISOLADO DE *B. caledonica* Bea110 E UM ISOLADO DE *I. javanica* Isa340. BARRAS DE ERRO REPRESENTAM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%. Teste de tukey a 0.05% $F=20.77$ gl 4,24 $P = 0.001$.



O isolado de *B. bassiana* Bea1 causou as menores taxas de infecção nas larvas em comparação com outros isolados em todas as concentrações de conídios e Bovemax® obteve mortalidade semelhante ao isolado *I. javanica* Isa340 em todas as concentrações exceto 10^7 e 10^8 conídios/mL. Os valores da concentração letal média (CL₅₀) e o tempo letal médio (TL₅₀) foram diferentes para cada isolado testado.

Os isolados Isa340 (*I. javanica*) e Bea111 (*B. bassiana*) apresentaram as menores concentrações efetivas (TABELA 2), com concentrações letais e tempo médio de $9,69 \times 10^5$ conídios/mL em 6,4 dias e $2,33 \times 10^6$ conídios/mL e 7,2 dias, respectivamente. A CL₅₀ para o isolado comercial Bovemax® (*B. bassiana*) foi de $1,41 \times 10^7$ conídios/mL, com um TL₅₀ similar (7,5 dias). Os resultados para os isolados Bea110 (*B. caledonica*) e Bea1 (*B. bassiana*) foram menos promissores, com maiores concentrações letais.

TABELA 2- A ANÁLISE DE REGRESSÃO DA MORTALIDADE PROBIT E LOG-CONCENTRAÇÃO DE DADOS DE BIOENSAIOS CONTRA LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE *D. fovealis*.

	Tratamentos				
	Bea1	Bea110	Bea111	Isa340	CG716***
N larval	601	557	609	645	432
*CL ₅₀	9.5×10^5	3.85×10^5	2.33×10^6	9.69×10^5	1.41×10^7
SE*	0.24±0.06	0.25±0.05	0.51±0.04	0.37±0.03	0.21±0.05
IC 95%	3.7×10^8 -	5.13×10^7 -	8.88×10^5 -	5.79×10^5 -	4.48×10^6 -
	5.09×10^9	5.6×10^9	5.34×10^6	3.12×10^6	8.38×10^7
χ^2 (df=4)	2.56	1.27	3.65	2.77	0.29
TL ₅₀ *	7.10	5.32	3.19	3.15	3.19
SE*	2.10±0.27	2.16±0.25	5.15±0.39	3.01±0.26	5.15±0.39
*IC 95%	6.04 a 9.03	4.68 a 6.25	3.00 a 3.38	2.88 a 3.43	3.00 a 3.38

*SLOPE / INTERVALO DE CONFIANÇA

** DIAS

*** CONTROLE POSITIVO – BIOINSETICIDA BOVEMAX®

3.3 Testes de eficiência dos fungos entomopatogênicos em casa de vegetação

Os isolados Bea111 (*B. bassiana*) e Isa340 (*I. javanica*) reduziram significativamente as populações de insetos. A mortalidade larval diferiu significativamente entre os tratamentos e o grupo controle ($F_{2,48} = 12,04$ P <0,05).

O primeiro isolado reduziu a infestação de larvas em 52% em comparação com o grupo controle que apresentou 17.41% de mortalidade, enquanto o segundo isolado causou uma redução de 45% na população inicial. A extrusão

fúngica ocorreu, em média, após cinco dias (Tabela 3). A temperatura média durante os ensaios foi de 20,5 °C.

TABELA 3- EFICÁCIA DE *B. bassiana* E *I. javanica* APÓS OS SETE DIAS DO TRATAMENTO EM MUDAS DE MORANGUEIRO EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos	Nº. de insetos iniciais	Após 7 dias do tratamento
		Eficácia (%)
Bea111 ¹ (2.33×10 ⁶)	200	52.68
Isa340 ¹ (9.69×10 ⁵)	200	45.83
Controle	200	17.41
² CV%	-	20.89

¹ CONCENTRAÇÃO APLICADA

^{a,b} MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY A 5% DE PROBABILIDADE.

²COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

4 DISCUSSÃO

Várias espécies de fungos entomopatogênicos foram avaliadas quanto ao seu potencial como agentes de controle de pragas utilizando bioensaios *in vitro* ou em condições de casa de vegetação ou de campo, com resultados promissores em diferentes pragas de várias culturas que já foram amplamente estudadas (WRAIGHT et al., 2010; BATTA, 2013; REDDY et al., 2014; CASTRO et al., 2016).

No entanto, estudos no âmbito do controle biológico de *D. fovealis* na cultura do morango são novos. Foram obtidos resultados significativos contra *D. fovealis* utilizando inimigos naturais como *Trichogramma galloi*, *T. exiguum* e *T. atopovirilia* e também a aplicação de conídios de fungos endofíticos isolados de folhas de morangueiro. (AMATUZZI et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; ZAWADNEAK et al., 2017). No presente estudo, nossos resultados são promissores e indicam a viabilidade de dois isolados de *Beauveria* e *Isaria* em programas MIP contra este inseto.

Em estudos recentes os autores avaliaram a patogenicidade e virulência de espécies entomopatogênicas contra várias ordens de inseto, os resultados de mortalidade encontrados foram similares ao deste estudo, evidenciando o potencial dos fungos entomopatogênicos para combater pragas agrícolas, ganhando cada vez mais atenção como pesticidas microbianos comerciais. (GODONOU et al. 2009; WRAIGHT et al. 2010; NUSSENBAUM; LECUONA, 2012).

Muitas espécies de fungos entomopatogênicos são avaliadas em seu potencial para controle de pragas em bioensaios em condições *in vitro* e em casa de vegetação, com resultados promissores para diversas pragas de diferentes cultivos (QUESADA-MORAGA et al., 2006; GODONOU et al., 2009; WRAIGHT et al., 2010; BATTA 2013; CABANILLAS; JONES et al., 2013; REDDY et al., 2014; CASTRO et al., 2016), porém não existem estudos na literatura relatando o uso de fungos entomopatogênicos para controle de *D. fovealis*, este é o primeiro trabalho que avalia a ação de fungos entomopatogênicos contra esta praga.

Nossos resultados mostram-se promissores e indicam a viabilidade dos isolados Bea111 e Isa340 em um programa de MIP contra o inseto já que demonstraram ser altamente virulentos e características como virulência e patogenicidade são consideradas propriedades importantes dos entomopatógenos aplicados no controle de pragas (THOMAS; ELKINTON, 2004).

A mortalidade mínima foi de 10% e a máxima 89%, porém esse padrão é esperado quando se testam diversos microrganismos provenientes do ambiente. Em outros estudos, utilizando diferentes pragas da ordem lepidóptera foram observados resultados similares. Como no estudo que avaliou larvas de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), frente a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, onde a mortalidade teve grande variação, entre 20 e 94% (GODONOU et al., 2009). No nosso trabalho os isolados de *M. anisopliae* apresentaram mortalidade entre 10 e 44%. Dentre os trabalhos de controle biológico feitos com isolados de *M. anisopliae*, estes expressam altas mortalidades (HUSSAIN et al., 2009; NUSSENBAUM et al., 2012) o que não foi alcançada em nosso estudo. O baixo desempenho de *M. anisopliae* pode ser justificado pela seletividade de certas

linhagens, que podem ter hospedeiros particulares como alvo (Schrank; Vainstein, 2010).

O isolado Bea110 (*B. caledonica*) obteve mortalidade acima de 60% nos testes de patogenicidade, porém o desempenho nos bioensaios de virulência revelam que o isolado não apresentou virulência significativa para *D. fovealis*, mas essa espécie pode ter uma relação hospedeira mais estrita com espécies de besouros. *B. caledonica* ocorre naturalmente em solos e como patógeno da praga do gorgojo, *Hylobius abietis* (Scolytinae: Curculionidae), e desenvolvendo-se em outros besouros em florestas, sabe-se que essa espécie é altamente patogênica para besouros adultos da espécie *Hylurgus ligniperda* (Coleoptera: Curculionidae), mortalidades atingiram entre 70 e 90% contra esta família (GLARE et al., 2008).

Os isolados Bea111 e Isa340 obtiveram os menores valores de CL50 quando comparado com os outros isolados e a linhagem comercial Bovemax® e TL50 equivalente ao obtido com a linhagem comercial. Valores das CL50 são considerados próximos ao que se encontra em outros estudos de virulência com *B. bassiana* contra pragas da ordem Lepidoptera e outras ordens de insetos, onde a media fica entre 10^4 e 10^6 conídios/mL (QUESADA-MORAGA et al., 2006; WRAIGHT et al. 2010)

O isolado de *I. javanica* apresentou a menor concentração letal entre todos os isolados, o sucesso deste isolado pode ser explicado pelo gênero *Isaria* ser considerado altamente virulento quando em contato com hospedeiros de diversas ordens de insetos (ZIMMERMANN, 2007). Estudos com espécies geneticamente semelhantes a *I. javanica* mostram a eficácia deste grupo contra vários tipos de praga, *Isaria fumosorosea* contra larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (HUANG et al., 2010) e *Isaria poprawskii* contra e ninfas de *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) (CABANILLAS; JONES, 2013) apresentaram CL₅₀ próximas ao encontrado em nosso trabalho, afirmando o grande potencial deste gênero entomopatogênico no controle biológico de pragas.

A avaliação em casa de vegetação mostrou que os isolados Bea111 e Isa340 causaram mortalidade entre 45 e 52%. Este resultado demonstra o efetivo sucesso dos isolados de *B. bassiana* e *I. javanica*, uma vez que a suspensão

pulverizada estava ajustada na CL₅₀ que fora determinada nos bioensaios de virulência.

Além disso, essa mortalidade pode estar associada a fatores como a temperatura, umidade relativa e arquitetura da planta. Em nossas observações a temperatura média da casa de vegetação durante o bioensaio foi sempre superior ao ambiente externo, propiciando condições adequadas ao desenvolvimento dos patógenos. A arquitetura da planta favorece um microclima favorável ao patógeno no extrato basal da planta e os hábitos crípticos das larvas que tendem habitar o mesmo extrato da planta podem ter contribuído para o sucesso dos patógenos (SHIPP et al., 2003; WRAIGHT et al., 2010)

Em conclusão, os isolados Bea111 e Isa340 causaram maior mortalidade em larvas de *D. fovealis*. Além disso, apresentaram o menor valor de CL₅₀. Este estudo indica o potencial dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica* como agentes de controle biológico contra *D. fovealis* em laboratório e em casa de vegetação como alternativa aos inseticidas químicos tradicionais empregados atualmente. Esta é a primeira vez que os fungos entomopatogênicos isolados do solo foram testados contra *D. fovealis*.

REFERÊNCIAS

AMATUZZI, R. F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; DALZOTO, P.; ZAWADENEAK, M. A.; PIMENTEL, I. C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, ahead of print Epub Nov 09, 2018.

BATTA Y .S. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**, v.44, p.128-134, 2013.

BONSIGNORE, C. P.; VACANTE, V. Emerging insects and pests in southern Italy. **Protezione delle Colture**, v.4, p. 25-31, 2009.

CABANILLAS, H.E., JONES, W.A. Pathogenicity of *Isaria poprawskii* (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) against the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae), under laboratory conditions. **Crop Protection**, v.50, p.46–52, 2013.

CABI International 2018: *Duponchelia fovealis* (Southern European marshland pyralid). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>, accessed 14.01.18

CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG, J.; MEYLING, N. V.; MORAL, R. A.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DELALIBERA I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.233, p.361-369, 2016.

EFIL, E.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. New pest, *Duponchelia fovealis* Zeller on strawberries in Turkey – damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.2,p.328-334, 2014.

FRANCO, C. M.; BAPTISTA, M. *Duponchelia fovealis* Zeller- nova praga em Portugal. **Revista Frutas, Legumes e Flores**, v.110, p. 34-35, 2010.

GLARE T. R.; REAY, S. D.; NELSON, T. L.; MOORE, R. *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. **Mycological Research**, v.112, p.352-360, 2009.

GODONOU, I.; JAMESA, B.; ATCHA-AHOWÉA, C.; VODOUHÈB, S.; KOOYMANC, C.; AHANCHÉDÉB, A.; KORIEA, S. Potential of *Beauveria bassiana*

and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v.28, p.220-224, 2009.

HAJEK, A. E.; DELALIBERA, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, v. 55, p. 147–158, 2010.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brow wheat mite. **Journal of Economic Entomology**, v.48, p.157-161, 1955.

HUANG, Z.; ALI, S.; REN, S. X.; WU, J. H. Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. **Insect Science**, v.17, p.140-148, 2010.

HUSSAIN, A.; TIAN, M. Y.; HE, Y. R.; AHMED, S. Entomopathogenic fungi disturbed the larval growth and feeding performance of *Ocinara varians* Walker (Lepidoptera: Bombycidae) larvae. **Insect Science**, v.16, p.511-517, 2009.

MCCOY, C. W. Entomogenous fungi as microbial pesticides. IN: Baker R.R. & Dunn P.E. (Eds.). **New directions in biological control**. Alan R. Liss, New York 139-159, 1990.

NUSSENBAUM ,A.L., LECUONA ,R.E. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, Issue 1,p.1-7, 2012.

ORTIZ-URQUIZA, A.; LUO, Z.; KEYHANI, N. O. Improving mycoinsecticides for insect biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.1057-68, 2015.

QUESADA-MORAGA, E.; MARANHAO, E.A.A.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements and toxicogenic activity. **Biological Control**, v.36, p.274–287, 2006.

QUESEDA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉZ, J.A.; MARANHAO, E.A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, v.111, p.947-966, 2007.

REDDY, G. V. P.; ZHAO Z.; HUMBER, R. A. Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.122, p.10-15, 2014.

ROBERTS, D. W.; LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v.54, p.1-70, 2004.

RODRIGUES, R.; JARAS, L.I.; POLTRONIERI, A. S.; PIMENTEL, I.C.; ZAWADNEAK, M.A.C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Entomo Brasilis**, v.10, p.26-32, 2017.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v.56, p.1267-1274, 2010.

SHIPP, J. L.; ZHANG, Y.; HUNT, D. W. A.; FERGUSON, G. Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for

control of greenhouse arthropod pests. **Environmental Entomology**, v.32, p.1154-1163, 2003.

STOCKS, S.D.; HODGES, A.A. **European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>), 2011

THOMAS, S. R.; ELKINTON, J. S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.146-151, 2004.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, S.T.; VANDENBERG, J.D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops, **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, Issue 3, p.186-199, 2010.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, p.89-93, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BORBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v. 114, p. 291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. 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**, v.18, p.865–901,2008.

Capítulo

4

Efeito Endofítico de *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica* em Bioensaio com Plantas do Morangueiro para o Controle da Lagarta-da-coroa *Duponchelia fovealis*

RESUMO

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga invasora e se tornou uma das mais destrutivas na cultura do morango no Brasil. Os fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Isaria* spp. são importantes reguladores naturais das populações de insetos através da infecção por contato e já foram isolados como endófitos de várias plantas. Neste estudo, bioensaios conduzidos em laboratório, determinaram a habilidade de dois isolados de *B. bassiana* (Bea111 e Bov 2) e um isolado de *Isaria javanica* (Isa 340) de colonizarem folhas de morangueiro e testá-los contra larvas de 1º e 3º ínstar de *D. fovealis* como endófitos de morangueiro. Foram testados dois métodos de inoculação, o primeiro foi a absorção da suspensão de conídios na concentração de 10^7 conídios/mL através das raízes de morangueiro e o segundo método foi através do contato das raízes com suspensão de conídios presentes em solos previamente contaminados. Para constatar a presença dos fungos como endófitos foi realizado o isolamento foliar através do método de desinfecção superficial das folhas. Os resultados obtidos mostram que a inoculação pelo método 1 foi eficaz enquanto que o método 2 não obteve resultados significativos. Nos intervalos de tempo de 7, 21 e 35 dias as mortalidades variaram entre os tratamentos, diminuindo em cada intervalo de tempo. A mortalidade das larvas de 3º ínstar também foi significativa em relação ao controle negativo, porém a cada intervalo de tempo ela diminuía. A mortalidade foi maior com as larvas de 1º ínstar em relação as larvas de 3º ínstar. O re-isolamento dos fungos Bea111, Bov2 e Isa340 a partir das folhas obteve frequência de 13,9 e 28% para o intervalo de 7 dias respectivamente, 8, 4, 10% no intervalo de 21 dias e 2,1 e 2% no intervalo de 35 dias. Pode-se concluir que os fungos colonizaram as mudas de morangueiro e se estabeleceram como endófitos, influenciando a mortalidade das larvas de *D. fovealis*.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos; endófitos; lagarta – da – coroa.

1 INTRODUÇÃO

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga de cultivos de morangueiro do Brasil. As plantas atacadas apresentam folhas com furos, murchas ou secas devido ao broqueamento da coroa. Essa espécie se alimenta das folhas, flores e frutos, debilitando ou levando à planta a morte e ocorre em todo o período do cultivo no morangueiro (ZAWADNEAK et al., 2016).

As estratégias atuais de controle contra esta praga são focadas principalmente em métodos mecânicos e culturais e a aplicação de pesticidas em plantas extremamente infestadas (BERNARDI et al., 2015). Esses métodos são de curto prazo ou ecologicamente questionáveis, por isso uma estratégia alternativa de controle com uso de fungos entomopatogênicos é relevante no manejo da praga (SCHEMMER et al., 2016).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos comuns de artrópodes, que ajudam na prevenção de surtos de populações de pragas (ZIMMERMANN, 2007, ZIMMERMANN, 2008; LACEY et al., 2015). Esses são testados contra várias pragas de insetos e muitas linhagens são licenciadas com sucesso como micoinseticidas inundativos (RAVENSBERG, 2011; SUJEETHA; SAHAYARAJ, 2014). Espécies de fungos entomopatogênicos já foram testadas nas populações de *D. fovealis* (AMATUZZI et al., 2018, não publicado) e fungos endófitos entomopatogênicos do morangueiro também foram testados em ensaios laboratoriais contra lagarta da coroa. (AMATUZZI et al., 2018).

Embora isolados virulentos de *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica* tenham sido eficazes contra larvas de *D. fovealis*, em condições de casa de vegetação, (AMATUZZI et al.2018) os conídios quando pulverizados no ambiente são afetados por diversos fatores, incluindo temperatura, umidade e radiação solar (ZIMMERMANN, 2007; ZIMMERMANN, 2008).

Com o objetivo de eliminar fatores ambientais adversos, a utilização de fungos entomopatogênicos como endófitos surge como uma nova estratégia de controle (VEGA, 2008; JABER ; OWNLEY, 2017; BARTA, 2018).

Geralmente, os endófitos são definidos como microrganismos existentes nos tecidos vegetais saudáveis sem causar sintomas aparentes ou danos aos seus hospedeiros (ARNOLD ; LUTZONI 2007). Eles são conhecidos por cumprir uma variedade de funções nas plantas que podem beneficiar seus hospedeiros, incluindo uma proteção contra fatores bióticos e abióticos (VEGA et al., 2008).

Sabe-se que fungos entomopatogênicos podem formar uma associação endofítica com plantas e os gêneros entomopatogênicos *Beauveria* e *Isaria* foram documentados como endófitos de plantas (VEGA et al., 2008). *B. bassiana* e *Isaria* spp. são patógenos comuns de insetos, são encontrados naturalmente como endófitos e foram introduzidos artificialmente várias espécies de plantas (JABER ; OWNLEY, 2017).

Existem evidências que fungos entomopatogênicos como endófitos podem reduzir indiretamente o dano de uma praga por meio da inibição do desenvolvimento e reprodução ou causando mortalidade (CHERRY et al., 2004; POSADA ; VEGA, 2006; AKELLO et al., 2009; QUESADA-MORAGA et al., 2009; GURULINGAPPA et al., 2010; AKELLO ; SIKORA, 2012; BATTA, 2013; MANTZOUKAS et al., 2015; BARTA, 2018).

O objetivo do presente estudo foi determinar se isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica* podem ser artificialmente estabelecidos como endófitos em mudas de morangueiro e investigar os efeitos desses isolados em larvas de 1º e 3º ínstar de *D. fovealis* em bioensaios de mortalidade em folhas colonizadas de morangueiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criação de *Duponchelia fovealis*

A criação foi estabelecida a partir de larvas coletadas em plantios de morangueiro (25°37'S, 49°04'E). Em laboratório foram mantidos em dieta artificial desenvolvida para *D. fovealis* em condições controladas (25 ± 2°C, UR: 60 ± 10%, fotofase de 12h) (ZAWADNEAK et al., 2017).

2.2. Linhagens de fungos entomopatogênicos

Foram utilizadas linhagens entomopatogênicas de *Beauveria bassiana* Bov2 (Genbank: KU751847) (POITEVIN et al., 2018), Bea111 (Genbank: KY471653) e *Isaria javanica* Isa340 (Genbank: KY488507) (AMATUZZI et al., 2018) que em bioensaios de contato direto causaram mortalidade superior a 70 % em larvas de *D. fovealis*.

Culturas monospóricas de cada isolado foram inoculadas em placas de Petri com meio níger (semente de níger 100 gramas L⁻¹, dextrose 1 g.L⁻¹, ágar bacteriológico 18 g.L⁻¹), e incubadas por 14 dias a 28 ± 2°C em fotofase de 12 horas. Posteriormente, conídios foram retirados com auxílio de espátula esterilizada e transferidos para tubos contendo solução salina 0,85% (NaCl + 0,01% Tween[®]80). Os tubos foram agitados vigorosamente e as suspensões filtradas. Com o auxílio um hemocitômetro as concentrações foram ajustadas para 1,5 × 10⁷ conídios/mL.

Para o preparo do inóculo adicionado ao solo, em frascos de 500 mL foram homogeneizadas 10 mL das suspensões em 100 mL de água destilada autoclavada + 0.03% Tween 80[®]. Com o auxílio um hemocitômetro as concentrações foram ajustadas para 1,5 × 10⁷ conídios/mL. A viabilidade de cada isolado foi verificada pela pulverização de 100 µl de uma suspensão com 10⁴ conídios/mL em placa de Petri com meio de cultura Sabouraud e mantidos a 25°C e 100% de UR por 16h. A viabilidade foi determinada pela visualização de 200 esporos em um microscópio (400 × ampliação). Foram considerados viáveis os esporos que apresentaram a formação do tubo germinativo. Este procedimento foi adotado para todos os isolados e a viabilidade foi > 90%.

2.3. Obtenção das mudas de morangueiro

As mudas de morangueiro do cultivar 'Albion' empregadas neste estudo foram oriundas do Chile e Importadas pela empresa Bioagro[®]. As mudas possuem

certificado fitossanitário de origem, atestando a fitossanidade do material, quanto a isenção de doenças e pragas no material vegetal utilizado neste trabalho.

2.4. Inoculação de *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica* em mudas de morangueiro

Mudas de morangueiro 'Albion' com 30 dias foram inoculadas com as linhagens de *B. bassiana* (Bea111 e BOV2) e *I. javanica* (Isa340) utilizando dois métodos diferentes: raízes imersas em uma suspensão de conídios (método 1) e inoculo com conídios dos fungos entomopatogênicos adicionado ao solo no momento do plantio junto a rizosfera das mudas de morangueiro (método 2).

Método 1. Dez mudas de morangueiro tiveram suas raízes imersas em 300 mL de uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ conídios/mL de cada linhagem por 120 minutos. Após este período, as mudas foram plantadas em vasos plásticos (500 mL) contendo 300 gramas de solo esterilizado em autoclave por duas horas a uma temperatura de 121°C e 1 ATM de pressão (SILVA JR et al., 2012). As plantas de morangueiro utilizadas como controle permaneceram por 120 minutos com raízes imersas em água destilada esterilizada, sendo posteriormente transplantadas conforme descrito anteriormente.

Método 2. Em vasos plásticos (500 mL) contendo 300 gramas de solo esterilizado foram feitas covas de 5 cm de profundidade \times 2 cm de diâmetro. No interior de cada cova foi acondicionado 10 mL de suspensão de conídios de cada linhagem na concentração de $1,5 \times 10^7$ conídios/mL. Posteriormente a muda de morangueiro foi plantada de modo que o inoculo permaneceu na rizosfera da planta. Nas plantas utilizadas como controle, as mudas de morangueiro foram plantadas sem o inóculo.

As plantas de morangueiro dos métodos 1 e 2 foram mantidas isoladas em casa de vegetação e regadas com 100 mL de água a cada 24 horas. Após 7, 21 e 35 dias da inoculação dos fungos entomopatogênicos, as folhas foram destacadas de modo aleatório e fornecidas para larvas de 1º e 3º instar de *D. fovealis* para verificar se a ocorrência de infecções fúngicas nos insetos e a capacidade de

colonização como endófitos nas mudas de morangueiro testadas ocorreram devido aos tratamentos testados.

Para cada método de inoculação foram utilizados quatro tratamentos (três isolados fúngicos + controle), sendo que em cada tratamento foram empregados 10 vasos, cada um contendo uma muda de morangueiro.

2.5. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos inoculados em mudas de morangueiro sobre larvas de *D. fovealis*

A metodologia empregada neste bioensaio foi adaptada de Poitevin et al., (2018). A patogenicidade dos fungos entomopatogênicos inoculados em plantas de morangueiro foi verificada com 7, 21 e 35 dias após a inoculação dos isolados em plantas de morangueiro. Neste bioensaio foram empregadas larvas de 1º e 3º ínstar de *D. fovealis*.

De cada muda inoculada foram destacadas duas folhas de morangueiro. Essas folhas tiveram os pecíolos envoltos em algodão e foram colocadas em tubos de vidro (10 mL) com água destilada esterilizada para manutenção do turgor. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e pincel de cerdas finas, foram inoculadas dez larvas de 1º e 3º ínstar de *D. fovealis* separadamente em cada folha

As folhas infestadas foram acondicionadas em caixas de acrílico (11 × 11 × 3,5 cm) e mantidas em condições controladas (25 ± 1°C, fotofase: 12 horas e UR: 60 ± 10%).

As avaliações de mortalidade foram realizadas seis dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, as larvas foram vistoriadas e os insetos mortos foram individualizados em câmara úmida (placas de Petri estéreis contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada) para favorecer o desenvolvimento do micélio e esporulação dos fungos para confirmação do agente causal (QAYYUM et al., 2015). Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições distintas para cada ínstar. Cada repetição foi formada por uma folha de morangueiro inoculada com 10 larvas de *D. fovealis*.

2.6. Colonização de plantas de morangueiro por fungos entomopatogênicos

A colonização das plantas pelos fungos entomopatogênicos foi avaliada nas mesmas datas em que foram realizados os bioensaios (item 2.5). De cada muda inoculada com as linhagens fúngicas por meio de dois métodos de exposição foi destacada uma folha de morangueiro, totalizando 120 folhas.

Essas folhas passaram por desinfecção superficial (ARAÚJO et al., 2010) e posteriormente foram cortadas em fragmentos (1cm²). As folhas fragmentadas foram colocadas separadas de modo equidistante em placas de Petri com meio BDA (HIMEDIA[®]) com a parte adaxial da folha virada para cima. As placas foram incubadas em câmara de incubação tipo BOD a 28± 2° C. Conforme o crescimento de fungos, estes foram purificados para posterior identificação macromorfológica e micromorfológica (KERN;BLEVINS, 1999)

Para o cálculo da frequência de isolamento (FI), ao final do isolamento foi avaliado o número de fragmentos que apresentaram crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos foliares avaliados de acordo com Azevedo et al. (2010).

2.7. Análise estatística

O percentual de mortalidade de larvas de *D. fovealis* de 1º e 3º instar expostas aos isolados por dois métodos de inoculação foram corrigidos pela mortalidade verificada no controle por meio da formula de Abbott (1925). Posteriormente foram submetidos a uma análise de normalidade (SHAPIRO ; WILK, 1965) e transformados por arco seno da raiz quadrada quando necessário, sendo submetidos a uma análise de variância ANOVA usando modelos lineares generalizados (ZAR et al., 2009).

Para a mortalidade de larvas, para isolados e os diferentes períodos de avaliação foram comparados por meio do teste de Tukey (p<0,05). A proporção de plantas colonizadas pelos isolados fúngicos foram comparadas por uma análise de variância ANOVA. O método de infecção, os isolados fúngicos e os diferentes

períodos de avaliação foram considerados fatores fixos neste modelo. O método de inoculação foi comparado por meio de um teste de Tukey ($p < 0.05$). As análises foram realizadas por meio do software estatístico Minitab (versão 17.0).

3 RESULTADOS

O estabelecimento dos fungos entomopatogênicos como endófitos nas folhas de morangueiro foi avaliado em 7, 21 e 35 dias depois da inoculação. O reisolamento dos fungos Bea111 e Bov2 que pertencem à espécie *B. bassiana* e Isa340 *I. javanica*, foi obtido a partir das folhas das mudas correspondentes aos tratamentos testados (FIGURA 1).

FIGURA 1 – COLONIZAÇÃO DE FRAGMENTOS FOLIARES POR *B. bassiana* –BEA111 (A) E BOV2 (B) e *I. javanica* - ISA340 (C).



FONTE: O autor (2017).

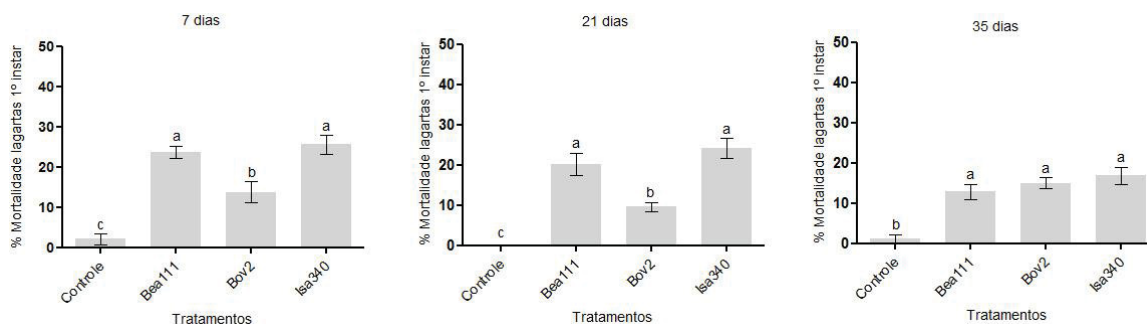
O método 1 de inoculação dos fungos entomopatogênicos através da absorção de suspensão de conídios através das raízes de morangueiro, demonstrou que as larvas de 1º e 3º ínstar são suscetíveis, nos intervalos diferentes de tempos, para os três tratamentos (Bea111, Bov2 e Isa340) em relação ao controle (FIGURA 2 e 3).

No intervalo de 7 dias, após a inoculação de *B. Bassiana* e *I javanica* por imersão das raízes nas suspensões de conídios, as mortalidades das larvas de 1º ínstar (FIGURA 2) frente aos tratamentos Bea111 (23.68%), Bov2 (13.78%) e

Isa340 (25.56%) apresentaram diferenças significativas ($F_{3,39} = 33.27$ $P < 0.0001$), entretanto Isa340 e Bea111 obtiveram maior mortalidade em relação ao Bov2.

No intervalo de 21 dias, as mortalidades das larvas de 1º ínstar apresentaram uma diferença significativa ($F_{3,39} = 26.70$ $P < 0.0001$) dos isolados Bea111 (20.25%) e Isa340 (24.25%) com o isolado Bov2 (9.58%) e no intervalo de 35 dias as mortalidades não indicaram diferenças significativas ($F_{3,39} = 22.75$ $P = 0.001$) entre os tratamentos Bea111 (12.83%), Bov2 (15.04%) e Isa340 (16.85%), onde as médias de mortalidade se mantiveram próximas.

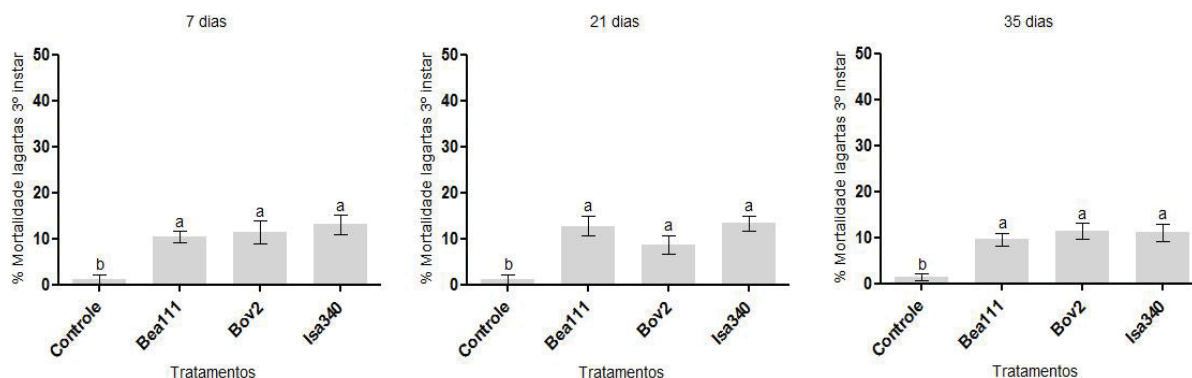
FIGURA 2 – MORTALIDADE DE LARVAS DE 1º ÍNSTAR EM TRÊS INTERVALOS DE TEMPOS DIFERENTES.



A mortalidade das larvas de 3º ínstar de *D. fovealis* foi significativa entre os tratamentos Bea111, Bov2 e isa340 em relação ao controle negativo, demonstrando que os fungos foram responsáveis pelas mortalidades observadas.

Comparando as mortalidades dos mesmos tratamentos contra as larvas de 3º ínstar nos intervalos de tempo de 7 dias ($F = 8.87$ gl 3.39 $P < 0.0001$), em 21 dias ($F_{3,39} = 16.31$ $P < 0.0001$) em 35 dias ($F_{3,39} = 13.23$ $P < 0.0001$) não foi observada diferença significativa, indicando que eles apresentaram o mesmo desempenho contra as larvas. As mortalidades de larvas de 3º ínstar no intervalo de 7 dias para Bea111, Bov2 e Isa340 foram respectivamente de 10.44, 11.45 e 13.10%, no intervalo de tempo de vinte um dias foram 12.74, 8.73 e 13.30% respectivamente e com intervalo de 35 dias as mortalidades foram respectivamente de 9.56, 11.41 e 11.09% (FIGURA 3).

FIGURA 3- MORTALIDADE DE LARVAS DE 3º ÍNSTAR EM TRÊS INTERVALOS DE TEMPOS DIFERENTES.

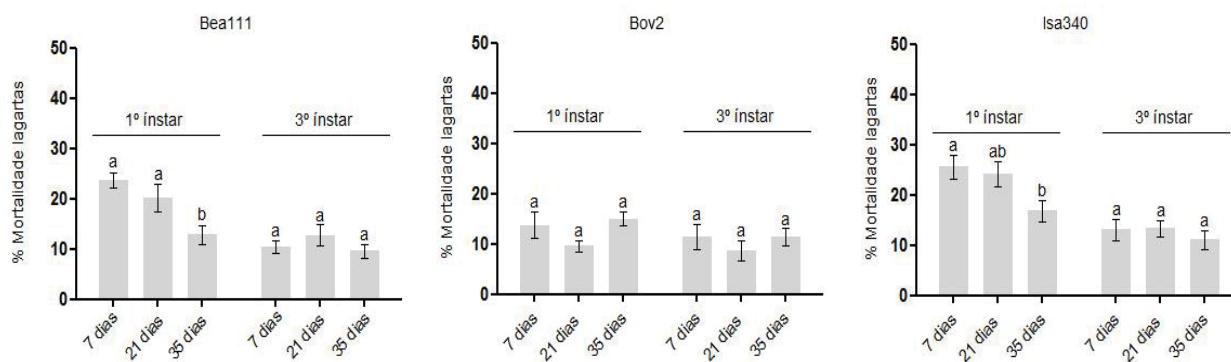


O tratamento Bea111 apresentou diferença significativa entre os intervalos de tempo de 7 e vinte um dias em relação ao intervalo de 35 dias na mortalidade das larvas de 1º instar ($F_{2,29} = 6.98$ $P = 0.004$) enquanto que para as larvas de 3º instar não houve diferença entre os intervalos de tempo ($F_{2,29} = 0.80$ $P = 0.461$) (FIGURA 4).

O tratamento Bov2 não apresentou diferença significativa entre os intervalos de tempo tanto para a mortalidade de larvas de 1º instar ($F_{2,29} = 2.48$ $P = 0.103$) como de 3º instar ($F_{2,29} = 0.55$ $P = 0.581$).

O tratamento Isa340 mostrou diferença entre a mortalidade de larvas de 1º instar e nos intervalos de tempo de 7 e 35 dias ($F_{2,29} = 4.81$ $P = 0.016$), porém a relação entre a mortalidade das larvas de 3º instar e os diferentes intervalos de tempo não apresentaram diferenças entre si ($F_{2,29} = 0.42$ $P = 1.664$).

FIGURA 4 - MORTALIDADE DE LARVAS DE 1º E 3º ÍNSTARES ENTRE OS TRATAMENTOS BEA111, BOV 2 E ISA340



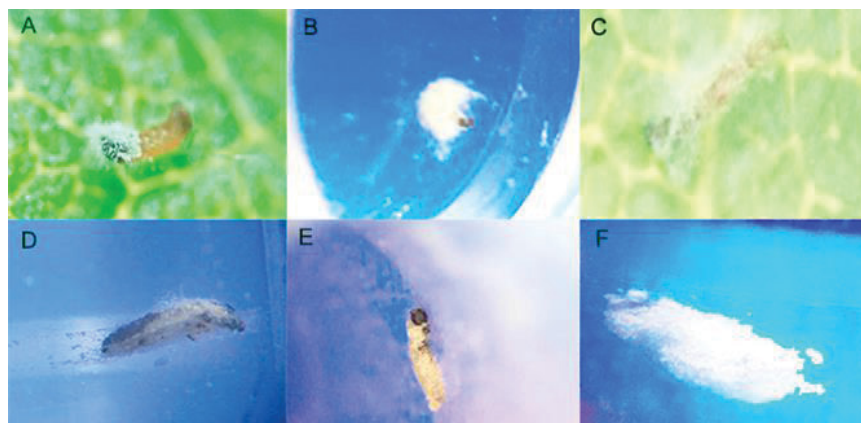
Comparando as mortalidades totais entre os dois ínstar entre os tratamentos Bea111, Bov2 e Isa340 observou-se que os isolados Bea111 e Isa340 não apresentam diferenças nas suas mortalidades contra larvas de *D. fovealis*, e isso foi observado também entre os isolados Bea111 e Bov2, porém existe uma diferença nas mortalidades entre os isolados Isa340 e Bov2.

Em relação ao controle negativo e os tratamentos Bea111, Bov 2 e Isa340 pode-se observar diferença significativa, demonstrando que a mortalidade das larvas foi provocada pelos fungos presentes nas plantas de morangueiro inoculadas. ($F_{3,23} = 14.19$ $P < 0.0001$). _

Todas as larvas apresentaram extrusão do micélio fúngico para todos os tratamentos, nos intervalos de 7,21 e 35 dias após a inoculação dos fungos.

A extrusão no intervalo de 7 dias foi observada durante a leitura do experimento, nos demais intervalos todas as larvas mortas foram incubadas em tubo eppendorf com algodão umedecido e num período entre cinco a dez dias observou-se a extrusão dos fungos (FIGURA 5).

FIGURA 5 – EXTRUSÃO DOS FUNGOS EM LARVAS DE *D. fovealis* - 1º ÍNSTAR IMAGENS A,B,C e 3º ÍNSTAR IMAGENS D,E,F. *B. bassiana* BEA111 (A;D), BOV2 (B;E), *I. javanica* ISA340 (C;F).



Fonte: O autor (2018)

A colonização (TABELA 1) total dos fungos recuperados das folhas de morangueiro variou entre os tratamentos Bea111 (24%), Bov2 (14,66%) e Isa340 (41.34%), onde foi observada uma diferença estatística entre eles, podendo-se

concluir que Isa340 obteve a maior colonização de folhas e Bov2 a menor proporção de folhas colonizadas ($F_{2,44} = 5.42$ $P = 0.008$).

Quando se compara as frequências em relação ao intervalo de tempo, o isolamento realizado em 7 ($F_{2,44} = 3.26$ $P = 0.048$) e 21 ($F_{2,44} = 1.82$ $P = 0.174$) dias após a inoculação dos fungos, o tratamento Isa340 apresentou a maior frequência de isolamento em ambos os tempos, enquanto que Bov2 apresentou a menor frequência, entretanto no intervalo de 21 dias os dados estatísticos não mostraram diferença significativa entre as médias das frequências dos tratamentos. No intervalo de tempo de 35 dias ($F_{2,44} = 0.21$ $P = 0.810$) as frequências de isolamento não apresentaram diferenças entre as suas médias, e foi observada a menor frequência de isolamento entre os tratamentos.

Relacionando os intervalos de tempo para cada tratamento em particular, observou-se que Bea111 apresentou maior frequência de isolamento no intervalo de 7 dias ($F_{2,44} = 5.17$ $P = 0.01$) assim como os tratamentos Isa340 ($F_{2,44} = 6.13$ $P = 0.005$) e Bov2 ($F_{2,44} = 2.88$ $P = 0.067$), entretanto o valor de F de Bov2 se aproximou, mas não atingiu a significância. Outro padrão observado foi a frequência nos intervalos de 35 dias, que foi menor em relação aos outros intervalos de tempo.

TABELA 1 – FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DOS TRATAMENTOS BEA111, BOV2 E ISA340 EM RELAÇÃO OS INTERVALOS DE TEMPO DE 7, 21 E 35 DIAS. COLUNAS: CLASSIFICAÇÃO COM LETRAS EM MINÚSCULAS E LINHAS APRESENTAM A CLASSIFICAÇÃO EM LETRAS MAIÚSCULAS. TUKEY $P < 0.05$.

Tratamentos	Frequência de isolamento (%)			
	7 dias	21 dias	35 dias	Total
Bea111	13.33abA	8aAB	2.67aB	24ab
Bov2	9.33bA	4aAB	1.33aB	14.66b
Isa340	28aA	10.67aAB	2.67aB	41.34a

No método 2, de inoculação através do contato das raízes com solo contaminado com suspensão de conídios, não houve diferença ($F_{3,39} = 1.04$ $P = 0,385$) entre as mortalidades, que não ultrapassaram 2% entre os tratamentos Bea111, Bov2 e Isa340 e o controle negativo. Não foi possível recuperar os fungos das folhas de morangueiro para o cálculo de frequência de isolamento.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenhado para avaliar a capacidade de colonização endofítica de dois isolados de *B. bassiana* e um de *I. javanica* e sua influência na mortalidade de larvas de diferentes ínstares de *D. fovealis*. A recuperação dos fungos das folhas de morangueiro indica o potencial desses isolados a tornarem-se agentes endofíticos de sucesso.

Beauveria bassiana e *Isaria fumosorosea* (espécie geneticamente próxima a *I. javanica*) já foram introduzidas artificialmente como endófitos em plantas como milho, tomate, algodão, papoula, videira, banana e sorgo (AKELLO et al., 2009; VEGA et al., 2008; QUESADA-MORAGA et al., 2009; MANTZOUKAS et al., 2015; JABER; ENKERLI, 2017, RONDOT; REINEKE, 2018), mas até o momento não foram relatados estudos de colonização de *B. bassiana* e *I. javanica* como endófitos de morangueiro.

Nosso estudo mostrou que é possível essas espécies colonizarem folhas do morangueiro como fungos endofíticos. Contudo, de forma geral, a colonização das folhas de morangueiro foi maior nas folhas recentemente inoculadas (7 dias) e a colonização declinou nos intervalos de tempo subsequentes.

Este padrão de declínio da colonização foi observado em outros trabalhos com *B. bassiana* e *I. fumosorosea* colonizando café, algodão, feijão, milho, tomate, sorgo e abóbora (POSADA; VEGA, 2006; POSADA et al, 2007; GURULINGAPPA et al., 2010; MANTZOUKAS et al., 2015).

O declínio da colonização ao longo do tempo pode ser causado pela resposta do hospedeiro a fungos heterotróficos, expansão de folhas com colônias já estabelecidas, ou a possível competição de outros endófitos presentes na planta (POSADA et al., 2007). A diminuição na colonização pode estar correlacionada com a diminuição da mortalidade larval de *D. fovealis* da primeira à quinta semana após a inoculação.

As taxas médias de colonização das folhas de morangueiro por *B. bassiana* e *I. javanica* foram entre 14% e 41%, sendo consideradas baixas quando

comparadas às taxas de colonização de folhas de outras espécies vegetais como milho (WAGNER; LEWIS, 2000), tomate (KLIEBER; REINEKE, 2016) e sorgo (TEFERA; VIDAL, 2009). A colonização de fungos entomopatogênicos em videira também apresentou baixas taxas de colonização através da inoculação pela pulverização das folhas com a suspensão de conídios (RONDOT et al., 2018).

A imersão da raiz ou inoculação do solo tem sido utilizada para o estabelecimento endofítico de fungos entomopatogênicos em banana (AKELLO et al., 2007), sorgo (TEFERA; VIDAL, 2009), mudas de pinus (BROWNBRIDGE et al., 2012), mandioca (GREENFIELD ET AL., 2016) e tomate (QAYYUM et al., 2015). O tempo de imersão das raízes (120 minutos) e a concentração ($1,5 \times 10^7$ conídios/mL) talvez precisem ser ajustados aumentando-se essas duas variáveis para a obtenção de maiores taxas de colonização de mortalidade.

Vários fatores podem alterar a aptidão de um entomopatógeno para se tornar endofítico, incluindo natureza do entomopatógeno, via de entrada, método de inoculação, compatibilidade ambiental, origem, estilo de vida, compatibilidade a outros entomopatógenos, reação a substâncias químicas vegetais e resposta a fatores bióticos e abióticos (QAYYUM et al., 2015).

As mortalidades causadas pelos tratamentos Bea111, Isa340 e Bov2 foram maiores nas larvas de 1º ínstar do que as de 3º ínstar. Resultados similares ao do nosso trabalho obtidos por QAYYUM et al.(2015) mostram o mesmo padrão, onde as larvas de 2º de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) foram mais suscetíveis do que larvas de 4º ínstar, isto pode ser explicado pela maior vulnerabilidade de lagartas de ínstars iniciais, que apresentam a cutícula mais fina e sistema de defesa menos estabelecido.

O estabelecimento do isolado Isa340 e Bea111 e Bov2 como endófitos e a associação com a eficácia contra larvas de *D. fovealis* indica o potencial desses isolados como uma opção de controle.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic of Entomology**, v.18, p.265–267, 1925.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.G.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal Invertebrate Pathology**, v.96, p.34–42, 2007.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; COYNE, D.; KYAMANYWA, S. The effects of *Beauveria bassiana* dose and exposure duration on colonization and growth of tissue cultured banana (*Musa* sp.) plants. **Biological Control**, v.49, p.6-10, 2009.

AKELLO, J.; SIKORA, R. Systemic acropetal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. **Biological Control**, v.61, p.215–221, 2012.

AMATUZZI R. F., CARDOSO N., POLTRONIERI A. S., POITEVIN C. G., DALZOTO P., ZAWADENEAK M. A. ; PIMENTEL I. C: Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). - **Brazilian Journal of Biology**, ahead of print Epub Nov 09, 2017.

AMATUZZI R. F., POLTRONIERI A. S., POITEVIN C. G., ZAWADENEAK M. A. ; PIMENTEL I. C Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**. Artigo aceito em 11/06/2018.

ARNOLD, E. A.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, p.541-549, 2007.

BARTA, M. In planta bioassay on the effects of endophytic *Beauveria* strains against larvae of horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*), **Biological Control**, v.121, p.88-98, 2018.

BATTA, Y. A. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**, v.44, p.128–134, 2013.

BROWNBIDGE, M.; REAY, S.D.; NELSON, T.L.; GLARE, T.R. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. **Biological Control**, v.61, p.194–200, 2012.

CHERRY, A.J.; BANITO, A.; DJEGUI, D.; LOMER, C. Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. **International Journal of Pest Management**, v.50, p.7–73, 2004.

GREENFIELD, M.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.I.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E.; KRAMER, M.; PARSA, S. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control**, v.95, p.40-48, 2016.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G.A.; MURDOCH, G.; MCGEE, P.A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biological Control**, v.55, p.34–41, 2010.

JABER, L. R.; SALEM, N. M. Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing

Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. **Biocontrol Science and Technology**, v.24, p.1096–1109, 2014.

JABER, L.R.; OWNLEY, B.H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biological Control**, v. 116, p. 36-45, 2017.

KLIEBER, J.; REINEKE, A. The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. **Journal of Applied Entomology**, v.140, p.580-589, 2016.

LACEY, L. A. **Microbial Control of Insect and Mite Pests From Theory to Practice** Ed. Elsevier. pp.482, 2015.

MANTZOUKAS, S.; CHONDROGIANNIS, C.; GRAMMATIKOPOULOS, G. Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v.154, p.78–87, 2015.

POITEVIN, C. G.; PORSANI, M. V.; POLTRONIERI, A. ; ZAWADNEAK, M. A. C. ; PIMENTEL, I. C. . Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 1, p. 1, 2018.

POSADA, F.; AIME, M.C.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; VEGA, F.E. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological Research**, v.111, p.749–758, 2007.

POSADA, F.; VEGA, F.E. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea Arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycoscience**, v.47, p.284–289, 2006.

QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T.; DUNLAP, C. A. Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. **Biological Control**, v. 90, p. 200-207, 2015.

QUESADA-MORAGA, E.; MUÑOZ-LEDESMA, F.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environ. Entomol.* 38, 723–730, 2009.

RAVENSBERG, W.J., 2011. Mass production and product development of a microbial pest control agent, in: Ravensberg, W.J. (Ed.), A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer, New York, pp. 59–127.

RONDOT, Y.; REINEKE, A. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. **Biological Control**, v.116, p.82-89, 2018.

SCHEMMER, R., CHLÁDEKOVÁ, P., MEDO, J., BARTA, M., 2016. Natural prevalence of entomopathogenic fungi in hibernating pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and virulence of selected isolates. *Plant Protect. Sci.* 52(3), 199–208.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. — **Biometrika**, v.52, p.591-611, 1965.

SILVA, J.R. J. M. T.; MENDES-FILHO, P. F.; GOMÉS, V. F. F.; GUIMARÃES, F. V. A.; DOS SANTOS, E. M. Efeito da esterilização do substrato sobre o crescimento de mudas de meloeiro em presença de fungos micorrízicos

arbusculares e compostos orgânicos. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 98-103, 2012.

SUJEETHA, J.A.R.P.; SAHAYARAJ, K. Role of entomopathogenic fungus in pest management, in: Sahayaraj, K. (Ed.), **Basic and applied aspects of biopesticides**. Springer, New Delhi, p. 31–46, 2014.

TEFERA, T.; VIDAL, S. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v.54, p.663-669, 2009.

VEGA, F.E.; POSADA, F. AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v.46, p.72-82, 2008.

VEGA, F.E. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.98, p.277–279, 2008.

VEGA, F.E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD, J.J., BLACKWELL, M. Chapter 6 – Fungal Entomopathogens, in: Vega F.E., Kaya H.K. (Eds.), **Insect Pathology**, 2nd edn. Academic Press, San Diego, p. 171–220, 2012.

WAGNER, B.; LEWIS, L. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3468-3473, 2000.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2009.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, p.89-93, 2016.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Duponchelia fovealis, também conhecida como a lagarta da coroa, acomete muitos cultivos de morangueiro no Brasil, principalmente na região sul, gerando perdas econômicas significativas. Este problema leva muitos produtores a escolherem métodos de controle rápidos, como o controle químico, que apesar de apresentar respostas rápidas, são de curta duração e quando usado sem a prescrição correta acarreta danos irreversíveis ao meio ambiente, produtores e consumidores.

A produção de morango apresenta uma demanda de manejo de pragas, principalmente daquelas pouco estudadas ou conhecidas. Neste contexto, está o controle biológico de pragas, uma tendência cada vez maior entre produtores. Diferente dos métodos de controle convencionais, este visa utilizar organismos vivos para controlar outros organismos, com a finalidade de equilibrar a densidade populacional da praga, impedindo que esta infeste cultivos ocasionando danos econômicos.

Devido a toda a problematização em torno dessa praga, esta tese foi realizada com objetivo de usar fungos entomopatogênicos, como agentes de controle da *D. fovealis*, e com grande sucesso conseguimos isolar de diferentes solos várias espécies com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria javanica* e *Lecanicillium* sp., consideradas entre muitos trabalhos excelentes para o controle de pragas de diversas ordens de insetos. O solo é um reservatório natural de fungos entomopatogênicos, e a sua prospecção é importante para descobrir novos isolados mais virulentos do que aqueles usados comercialmente.

Testando uma alta concentração de conídios (10^9), esses fungos apresentaram eficácia da mortalidade de larvas de 3º ínstar e alguns isolados de *B. bassiana* e *I. javanica* em especial Bea111 e Isa340 respectivamente, obtiveram concentração letal média significativa e eficácia contra as larvas em testes em casa de vegetação, demonstrando o potencia deles para combater esta praga. Esses também apresentaram o potencial de colonizar folhas de

morangueiro como endófitos e efeito na mortalidade de larvas de 1º e 3º de *D. fovealis*.

Muitas espécies de pragas da ordem Lepidóptera apresentam suscetibilidade a fungos entomopatogênicos e nosso trabalho demonstrou que *D. fovealis* é suscetível às espécies *B. bassiana* e *I. javanica* e que futuramente podem ser aplicadas no controle desta praga. Este é o ponto de partida para o desenvolvimento de um novo inseticida biológico, onde serão necessários mais estudos e submissões a agências reguladoras que aprovelem essas linhagens para uso comercial.

REFERENCIAS GERAIS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic of Entomology**, v.18, p.265–267, 1925.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; COYNE, D.; KYAMANYWA, S. The effects of *Beauveria bassiana* dose and exposure duration on colonization and growth of tissue cultured banana (*Musa* sp.) plants. **Biological Control**, v.49, p.6-10, 2009.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.G.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **J. Invertebrate Pathology**, v.96, p.34–42, 2007.

AKELLO, J.; SIKORA, R. Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. **Biological Control**, v.61, p.215–221, 2012.

ALMEIDA, D. **Manual de Culturas Hortícolas** -. Lisboa: Editorial Presença. v.2, 1ª ed., p. 195-219, 2006.

ALTIERI, M. **Agroecologia: A dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 4.ed., ed. da UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of proLtein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2ªed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

AMATUZZI, R. F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; DALZOTO, P.; ZAWADENEAK, M. A.; PIMENTEL, I. C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, ahead of print Epub Nov 09, 2017.

AMATUZZI R. F., POLTRONIERI A. S., POITEVIN C. G., ZAWADENEAK M. A. ; PIMENTEL I. C Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**. Artigo aceito em 11/06/2018.

ANTUNES L. E. C.; CARVALHO G. L.; SANTOS, A. M. **A cultura do morango**— 2.ed. rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica,. 52 p. – 2011 (Coleção Plantar, 68).

ANTUNES LEC; DUARTE FILHO J. 2005. Importância do cultivo. In: **Sistema de produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>. Acessado em 21 de agosto de 2017.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; VIGNOLO, G. K.; GONÇALVES, M. A. Morangos do jeito que o consumidor gosta. **Campo ; Lavoura**, Anuário HF, n. 1, p.64-72, 2015.

ARNOLD, E. A.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, p.541-549, 2007.

BADALI, H.; CARVALHO, V. O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; WIATKOWSKI, I. B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of

Chaetothyriales revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 47, p. 55-66, 2009.

BAINIER, G. Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. **Bulletin de la Société Mycologique de France**, v.23, p. 26–27, 1907.

BARNETT, H. C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987.

BARTA, M. In planta bioassay on the effects of endophytic *Beauveria* strains against larvae of horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*), **Biological Control**, v.121, p.88-98, 2018.

BATTA Y .S. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**, v.44, p.128-134, 2013.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA; ZAWADNEAK, C. A. M. **Guia para a identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. **Biological Control**, v. 55, p. 7 - 16, 2009.

BONSIGNORE, C. P.; VACANTE, V. Emerging insects and pests in southern Italy. **Protezione delle Colture**, v.4, p. 25-31, 2009.

BOOMSMA, J.J., JENSEN, A.B., MEYLING, N.V., EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, v.59, p.467–485, 2014.

BOTTON, M; KOVALESKI, A; FERLA, J. N; PINENT, J. M. S. Controle de Pragas. **Produção de Morangos no Sistema Semi-Hidropônico**. Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de Produção, 15. Versão Eletrônica. Dez/2006.

BROWNBIDGE, M.; REAY, S.D.; NELSON, T.L.; GLARE, T.R. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. **Biological Control**, v.61, p.194–200, 2012.

BRUCK, D.J. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. **Biological Control**, v.55, n.1, p.103-112, 2010.

CABANILLAS, H.E., JONES, W.A. Pathogenicity of *Isaria poprawskii* (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) against the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae), under laboratory conditions. **Crop Protection**, v. 50, p.46–52, 2013.

CABI International 2018: *Duponchelia fovealis* (Southern European marshland pyralid). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/2018>, accessed 14.01.18

CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG, J.; MEYLING, N. V.; MORAL, R. A.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DELALIBERA I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.233, p.361-369, 2016.

CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, v. 40, p.241–321, 2003.

CHARNLEY, A. K.; COLLINS, S. A. **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. 2.ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, p. 159-184, 2007.

CHERRY, A.J.; BANITO, A.; DJEGUI, D.; LOMER, C. Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. **International Journal of Pest Management**, v.50, p.7–73, 2004.

D'ALESSANDRO, C.P.; JONES, L.R.; HUMBER, R.A.; LOPEZ-LASTRA, C.C.; SOSA-GOMEZ, D.R. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. **Journal of Basic Microbiology**, v.54, p.21–31, 2014.

DAROLT, M.R. Morango orgânico: opção sustentável para o setor. **Revista Campo e Negócios**, v.34, p.58-61, 2008.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, W.H.A. A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. **Mycological Research**, v.104, p.135–151, 2000.

DUNLAP, C.A.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; JACKSON, M.A. Rapid discrimination of *Isaria javanica* and *Isaria poprawskii* from *Isaria* spp. using high resolution DNA melting assays. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.150, p.88-93, 2017.

EFIL, E.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. New pest, *Duponchelia fovealis* Zeller on strawberries in Turkey – damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.2,p.328-334, 2014.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biological Control**, v. 46, p.387–400, 2001.

FACHINELLO, J.C. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.109-120, 2011.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Production/ strawberry. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> E >. Acessado em: 28 de maio de 2017.

FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, N.; ROBERTS, D. W. CTC medium: a novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v.54, p.197-205, 2010

FRANCO, C. M.; BAPTISTA, M. *Duponchelia fovealis* Zeller- nova praga em Portugal. **Revista Frutas, Legumes e Flores**, v.110, p. 34-35, 2010.

FUXA, J.R.; TANADA, Y. Epizootiology of insect diases. New York: **Wiley-interscience**, 1987.

GALLOU, A.; SERNA-DOMÍNGUEZ, M.G.; BERLANGA-PADILLA, A.M.; AYALAZERMEÑO, M.A.; MELLÍN- ROSAS, M.A.; MONTESINOS-MATÍAS, R.; ARREDONDO-BERNAL, H.C. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. **Fungal Biology**, v.120,p. 414–423, 2016.

GAMS, W.; HODGE, K.T.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P. Proposal to conserve the name *Isaria* (anamorphic fungi) with a conserved type. **Taxon**,v.52, p. 537, 2005.

GARRIDO-JURADO, I.; FERNANDEZ-BRAVO, M.; CAMPOS, C.; QUESADA-MORAGA, E. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.130, p.97-106, 2015.

GLARE T. R.; REAY, S. D.; NELSON, T. L.; MOORE, R. *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. **Mycological Research**, v.112, p.352-360, 2009.

GLARE, T. R.; MILNER, R. J.; BEATON, C. D. Variation in *Metarhizium* a genus of fungal pathogens attacking Orthoptera : Is phialide morphology a useful criterion? **Journal of Orthopteran Research**, v.5, p.19-27, 1996.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GODONOU, I.; JAMESA, B.; ATCHA-AHOWÉA, C.; VODOUHÈB, S.; KOOYMANC, C.; AHANCHÉDÉB, A.; KORIEA, S. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v.28, p.220-224, 2009.

GOTTWALD, T.R.; TEDDERS, W.L. Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. **Environmental Entomology**, v.13, p. 557–560,1984.

GREENFIELD, M.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.I.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E.; KRAMER, M.; PARSA, S. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control**, v.95, p.40-48, 2016.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G.A.; MURDOCH, G.; MCGEE, P.A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biological Control**, v.55, p.34–41, 2010.

HAJEK, A. E.; DELALIBERA, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **Biological Control**, v. 55, p. 147–158, 2010.

HAJEK, A.E.; LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293–322, 1994.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brow wheat mite. **Journal of Economic Entomology**, v.48, p.157-161, 1955.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNDORF, S. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p.509–547, 2007.

HODGE, K.T.; GAMS, W.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P. Lectotypification status of *Isaria* Pers.:Fr. **Taxon**, v.52, p.485–489, 2005.

HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5260–5266, 2005.

HUANG, Z.; ALI, S.; REN, S. X.; WU, J. H. Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. **Insect Science**, v.17, p.140-148, 2010.

HUSSAIN, A.; TIAN, M. Y.; HE, Y. R.; AHMED, S. Entomopathogenic fungi disturbed the larval growth and feeding performance of *Ocinara varians* Walker (Lepidoptera: Bombycidae) larvae. **Insect Science**, v.16, p.511-517, 2009.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, p. 23- 69, 2001.

JABBOUR, R.; BARBERCHECK, M.E. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. **Biological Control**, v.51, 435-443, 2009.

JABER, L. R.; SALEM, N. M. Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. **Biocontrol Science and Technology**, v.24, p.1096–1109, 2014.

JABER, L.R.; OWNLEY, B.H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biological Control**, v. 116, p. 36-45, 2017.

KEANE, R.M.; CRAWLEY, M.J. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. **Trends in Ecology & Evolution**, v.17, p.164–170, 2002.

KELLER, S.; ZIMMERMANN, G.. Mycopathogens of soil insects. London (United Kingdom), **Academic Press**, p. 240–270, 1989

KERN, M. E. **Medical mycology: A self- instructional text**. 3 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1988.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica** – Texto e Atlas. 2 ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KLIEBER, J.; REINEKE, A. The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. **Journal of Applied Entomology**, v.140, p.580-589, 2016.

KLINGEN, I.; EILENBERG J, MEADOW R. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.91, p. 191–198, 2002.

KLINGEN, I.; HAUKELAND, S. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg, J and Hokkanen, H.M.T (Eds.), **An ecological and societal approach to biological control. Series: Progress in biological control**, v.2 Springer, p.145-211, 2006.

LACEY, L. A. **Microbial Control of Insect and Mite Pests From Theory to Practice** Ed. Elsevier. pp.482, 2015.

LIMA, E.A.L.A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**,v. 84, supl.3, p.17-20, 1989.

LOPES R.B.; MESQUITA, A.L.M.; TIGANO, D.A.; SOUZA, M.S.; MARTINS, I.; FARIA, M. Diversity of indigenous *Beauveria* and *Metarhizium* spp. in a commercial banana field and their virulence toward *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Fungal Ecology**, v.6, p.356-364, 2013.

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

MANTZOUKAS, S.; CHONDROGIANNIS, C.; GRAMMATIKOPOULOS, G. Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the

stalk borer *Sesamia nonagrioides*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v.154, p.78–87, 2015.

MCCOY, C. W. Entomogenous fungi as microbial pesticides. IN: Baker R.R. & Dunn P.E. (Eds.). **New directions in biological control**. Alan R. Liss, New York 139-159, 1990.

MEDO, J.; CAGÁN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, p. 200-208, 2011.

MESSING, R. H.; WRIGHT, M. G. Biological control of invasive species: solution or pollution. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.4, p.132–140, 2006.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, p. 145-155, 2007.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agrosystem. **Agriculture, Ecosystems ; Environment**, v.113, p. 336-341, 2006.

MEYLING, N. V.; THORUP-KRISTENSEN, K.; EILINBERG, J. Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. **Biological Control**, v. 59, p. 180–186, 2011.

MIRANDA, F.; FERNANDES, T. D. **Manual de boas práticas: Morango**. Porto: ESB, UCP, 2001.

NONDILLO, A.; REDAELLI, L. R.; PINENT, S. M. J.; BOTTON, M. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae) em morangueiro. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 4, p. 679-683, 2009.

NUSSENBAUM ,A.L., LECUONA ,R.E. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, Issue 1,p.1-7, 2012.

ORTIZ-URQUIZA, A.; LUO, Z.; KEYHANI, N. O. Improving mycoinsecticides for insect biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.1057-68, 2015.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA- FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Ed. Manole, São Paulo, SP, 2002.

PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, v. 55, p.187–198, 2010.

PÉREZ-GONZÁLEZ, V.H.; GUZMÁN-FRANCO, A.W.; ALATORRE-ROSAS, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A.; CARRILLO-BENÍTEZ, M.G.; BAVERSTOCK, JASON. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 54-61, 2014.

POSADA, F.; AIME, M.C.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; VEGA, F.E. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological Research**, v.111, p.749–758, 2007.

POITEVIN, CAROLINA GRACIA; PORSANI, MARIANA VIEIRA ; POLTRONIERI, ALEX SANDRO ; ZAWADNEAK, MARIA APARECIDA CASSILHA ; PIMENTEL, IDA CHAPAVAL . Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 1, p. 1, 2018.

POSADA, F.; VEGA, F.E. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea Arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycoscience**, v.47, p.284–289, 2006.

QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T.; DUNLAP, C. A. Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. **Biological Control**, v. 90, p. 200-207, 2015.

QUESADA-MORAGA, E.; MARANHAO, E.A.A.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements and toxicogenic activity. **Biological Control**, v.36, p.274–287, 2006.

QUESADA-MORAGA, E.; MUÑOZ-LEDESMA, F.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environ. Entomol.*38, 723–730, 2009.

QUESEDA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; MARANHAO, E. A. A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, v. 111, p. 947- 966, 2007.

RAVENSBERG, W.J., 2011. Mass production and product development of a microbial pest control agent, in: Ravensberg, W.J. (Ed.), A roadmap to the

successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer, New York, pp. 59–127.

REDDY, G. V. P.; ZHAO Z.; HUMBER, R. A. Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.122, p.10-15, 2014.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J.J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v.103, p.1055-1073, 2011.

ROBERTS, D. W.; LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v.54, p.1-70, 2004.

RODRIGUES, R.; JARAS, L.I.; POLTRONIERI, A. S.; PIMENTEL, I.C.; ZAWADNEAK, M.A.C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Entomo Brasilis**, v.10, p.26-32, 2017.

RONDOT, Y.; REINEKE, A. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. **Biological Control**, v.116, p.82-89, 2018.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies Mycology**, v.6, p.1–119, 1974.

SCHEMMER, R., CHLÁDEKOVÁ, P., MEDO, J., BARTA, M., 2016. Natural prevalence of entomopathogenic fungi in hibernating pupae of *Cameraria ohridella*

(Lepidoptera: Gracillariidae) and virulence of selected isolates. *Plant Protect. Sci.* 52(3), 199–208.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v.56, p.1267-1274, 2010.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. — **Biometrika**, v.52, p.591-611, 1965.

SHIN, T.Y.; LEE, W.W.; SEUNG, H.K.; CHOI, J.B.; BAE, S.M.; CHOI, J.Y.; BAE, S.M.; CHOI, J.Y.; LEE, K.S.; JE, Y.H.; JIN, B.R.; WOO, S.D. Distribution and characterisation of entomopathogenic fungi from Korean soils. **Biological control Science Technology**, v.23, p.288-304, 2013.

SHIPP, J. L.; ZHANG, Y.; HUNT, D. W. A.; FERGUSON, G. Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pests. **Environmental Entomology**, v.32, p.1154-1163, 2003.

SILVA, J.R. J. M. T.; MENDES-FILHO, P. F.; GOMÉS, V. F. F.; GUIMARÃES, F. V. A.; DOS SANTOS, E. M. Efeito da esterilização do substrato sobre o crescimento de mudas de meloeiro em presença de fungos micorrízicos arbusculares e compostos orgânicos. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 98-103, 2012.

STOCKS, S.D.; HODGES, A.A. **European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>, 2011

STRASSER, H.; FORER, A.; SCHINNER, F. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. **AgResearch**, Lincoln, New Zealand, p 125–130, 1996.

SUJEETHA, J.A.R.P.; SAHAYARAJ, K. Role of entomopathogenic fungus in pest management, in: Sahayaraj, K. (Ed.), **Basic and applied aspects of biopesticides**. Springer, New Delhi, p. 31–46, 2014.

TEFERA, T.; VIDAL, S. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v.54, p.663-669, 2009.

THOMAS, S. R.; ELKINTON, J. S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.146-151, 2004.

TKACZUK, C.; KRÓL, A.; MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A.; NICEWICZ, Ł. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. **Journal of Ecological Engineering**, v.15, p.137-144, 2014.

VEGA, F.E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.98, p.277–279, 2008.

VEGA, F.E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD, J.J., BLACKWELL, M. Chapter 6 – Fungal Entomopathogens, in: Vega F.E., Kaya H.K. (Eds.), **Insect Pathology**, 2nd edn. Academic Press, San Diego, p. 171–220, 2012.

VEGA, F.E.; POSADA, F. AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v.46, p.72-82, 2008.

WAGNER, B.; LEWIS, L. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3468-3473, 2000.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Apud **Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, p. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, S.T.; VANDENBERG, J.D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops, **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, Issue 3, p.186-199, 2010.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2009.

ZAWADNEAK, M. A. C.; BOTTON, M.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; VIDAL, H. R. Pragas do morangueiro. In: Zawadneak, M. A. C; Schuber, J. M; Mógor; Atila, F. (Org.). **Como produzir morangos**. 1ed. Curitiba: Editora UFPR, v. 1 p. 101-145, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; PIMENTEL, I. C.; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A. S.; SOLIS, M. A. First record of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, p.89-93, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; POLTRONIERI, A. S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A. M.; BORBA, A. M.; PIMENTEL, I. C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v. 114, p. 291-294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H.R.; SANTOS, B. Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). In: Evaldo Vilela; Roberto A. Zucchi. (Org.). **Pragas Introduzidas: Insetos e Ácaros**. 2ed.Piracicaba, SP: ESALQ/ FEALQ, v.01, p. 216-231, 2014.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, p.553–596, 2007.a

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, p.879-920, 2007.b

ZIMMERMANN, G. 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**, v.18, p.865–901,2008.