

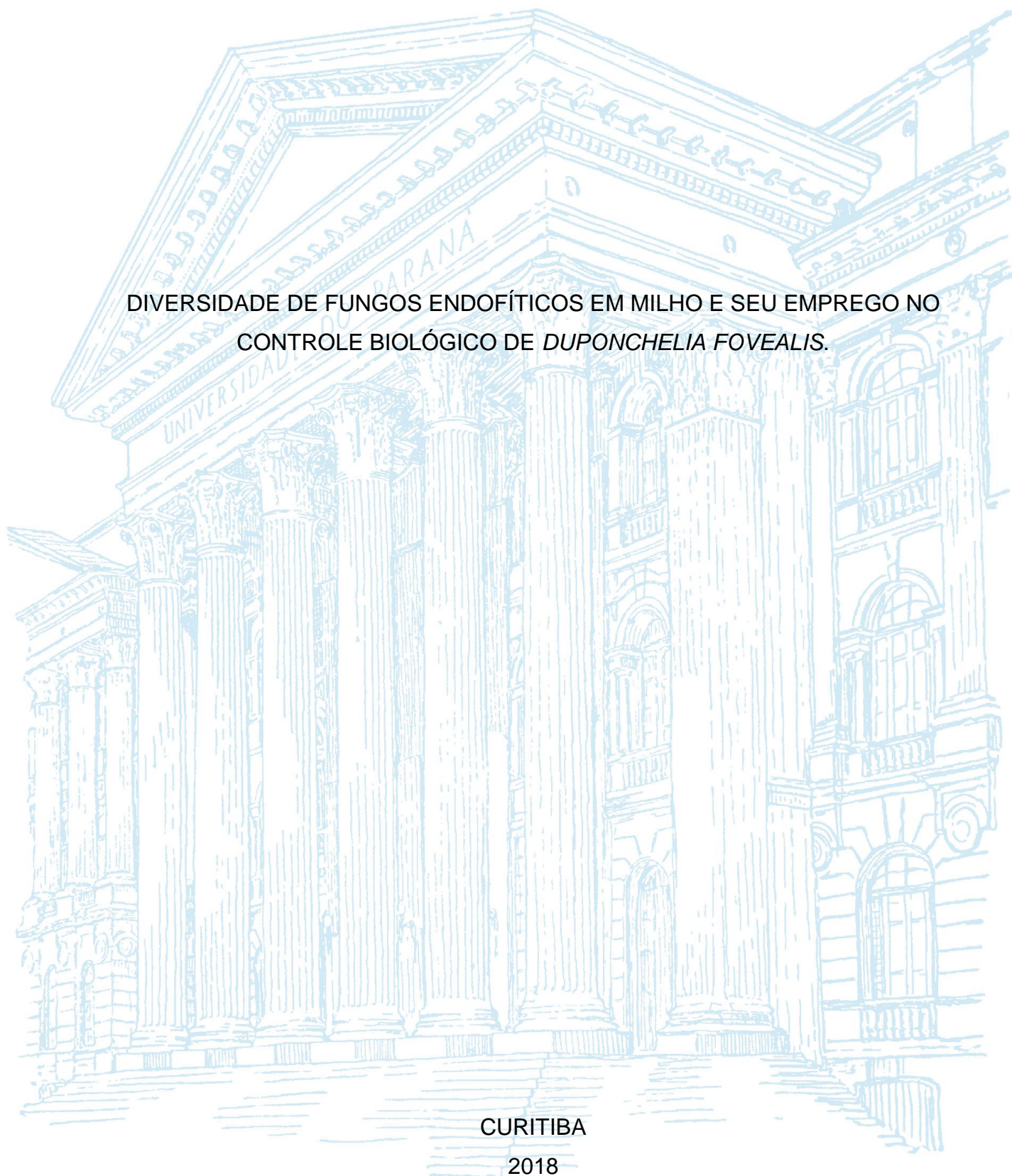
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁYRA LUANA GOOSSEN BREDÁ

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MILHO E SEU EMPREGO NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE *DUPONCHELIA FOVEALIS*.

CURITIBA

2018



MÁYRA LUANA GOOSSEN BREDA

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MILHO E SEU EMPREGO NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE *DUPONCHELIA FOVEALIS*

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia do Rocio Dalzoto.

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

MAYRA LUANA GOOSSEN BREDÁ

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MILHO E SEU EMPREGO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *DUPONCHELIA FOVEALIS*.

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Prof^a. Dra. Patrícia do Rocio Dalzoto
Orientadora - Departamento de Patologia Básica – UFPR

Prof^a. Dra Lucy Ono
Departamento de Patologia Básica – UFPR

Prof^a. Dra Marcia Regina Beux
Departamento de Patologia Básica – UFPR

Curitiba, 26 de Novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus a quem confiei minhas orações, pois sem a sua graça não teria força e não teria chegado ao fim desta caminhada.

Agradeço à minha irmã Maysa Cristina Goossen Breda por todo apoio e pelas palavras que me fortaleceram.

Agradeço ao meu noivo Eduardo Marcel Cosmo, que ao longo desses meses me deu não só força, mas apoio para vencer essa etapa da vida acadêmica. Obrigada, por suportar as crises de estresse e minha ausência em diversos momentos.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida, em especial à professora que eu muito admiro, a minha orientadora Patrícia Dalzoto por todo conhecimento, oportunidades, paciência e carinho que me foi transmitido durante esses anos de graduação e em especial durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de estudo.

Agradeço ao LABMICRO pelo fornecimento dos materiais e o local para a realização deste trabalho.

Agradeço à Rafaela, Franciele e Carolina que sempre me ajudaram muito em laboratório.

Um agradecimento mais que especial a minha amiga Adriane Martins, que é a minha grande companheira e que me ajudou muito na graduação me dando apoio e força para continuar e esteve no meu lado nos momentos mais complicados e deixou os meus dias mais felizes e também foi minha grande companheira durante a realização deste trabalho em todos os momentos.

Agradeço às minhas amigas Fernanda e Juliana que compartilharam conhecimento, apoio por toda ajuda e por todos os momentos de muita alegria dentro e fora da universidade.

Agradeço ao Outback Steakhouse pela oportunidade de concluir a graduação.

Agradeço à banca por ter aceitado o convite e pelas contribuições para aperfeiçoamento do trabalho.

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é um cereal cultivado em grande parte do mundo, sendo de suma importância no Brasil, devido às suas qualidades nutricionais. Diante das suas diversas formas de utilização tornou-se um dos grãos mais importantes do setor agrícola no Brasil. Os fungos endofíticos, encontrados potencialmente em todas as plantas, podem protegê-las de organismos prejudiciais, seja pela produção de substâncias inibidoras de outros microrganismos ou mesmo por sua atividade entomopatogênica. Durante os últimos 11 anos (2007-2018) foram realizados 6 isolamentos de endofíticos de plantas de milho, no intuito de acessar a diversidade destes, bem como de encontrar fungos que pudessem ser utilizados no controle biológico de insetos pragas do milho e de outras plantas. O presente trabalho teve dois objetivos principais: o primeiro foi isolar e caracterizar fungos endofíticos de plantas de milho coletadas em Prudentópolis, PR, e testar a eficiência dos fungos entomopatogênicos isolados contra a lagarta *Duponchelia fovealis*, uma praga do morangueiro. O segundo objetivo foi compilar os resultados obtidos pelo grupo do LabMicro-DPAT-UFPR ao longo de 11 anos de projeto (2007-2018), evidenciando a diversidade fúngica encontrada em plantas de milho de diferentes cidades do Paraná. No último isolamento (2018), 20 plantas de milho foram coletadas no Município de Prudentópolis – PR, e passaram por um processo de desinfecção superficial, foram cortadas em fragmentos de 1cm² e depositadas em 120 placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de estreptomicina (0,4g/ml). As placas foram incubadas a 28 ±2°C por 30 dias e os fungos foram identificados com base na macro e micromorfologia. Foram isolados 624 fungos correspondendo à porcentagem de infecção de 100% e agrupados em 80 morfogrupos. Foram identificados *Isaria* sp., *Beauveria bassiana*, *Drechslera* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Rhizopus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., e *Acremonium* sp. Dentre estes isolados, os gêneros *Beauveria* e *Isaria* são relatados como entomopatogênicos na literatura, portanto foram selecionados 7 isolados de *Isaria* e 1 isolado de *Beauveria bassiana* para o bioensaio contra *D. fovealis*. Dez lagartas de 3º ínstar foram selecionadas e depositadas em 10 folhas de morangueiro. Cada folha foi então aspergida com a suspensão fúngica, na concentração 1,0 x 10⁸ esporos/mL. Foram realizados 9 tratamentos, sendo 7 deles com *Isaria* sp., 1 com *B. bassiana* e 1 controle. Cada folha correspondeu a uma repetição, totalizando 10 repetições. Ao

longo de 7 dias a mortalidade das lagartas foi avaliada e os dados foram submetidos a uma análise de variância, seguida de teste de Tukey, de modo a evidenciar as diferenças entre os tratamentos. Estaticamente, todos os tratamentos foram iguais, ou seja, os isolados testados não foram efetivos no controle de *D. fovealis*. Os dados obtidos em 6 isolamentos, ao longo dos 11 anos de projeto (2007-2018) demonstram que os gêneros isolados em 11 anos foram: *Alternaria*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Blastomyces*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Mycelia sterilia*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Beauveria* e *Isaria*, totalizando 1623 isolados. As frequências de infecção foram muito variáveis, compondo uma média de 57,41%, sendo a menor frequência 10,8% e a maior 100%, indicando que pode haver variação na diversidade e na frequência de infecção de acordo com o local e a época da coleta. Estes resultados demonstram a diversidade dos fungos encontrados em milho, bem como seu potencial no controle biológico de pragas de importantes culturas.

Palavras-chave: Milho. Fungos endofíticos. Fungos entomopatogênicos. Controle biológico. Lagarta-da-coroa.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays*) is a cereal grown in much of the world, being of great importance in Brazil, due to its nutritional qualities. In view of its various uses, it has become one of the most important grains of the agricultural sector in Brazil. Endophytic fungi, potentially found in all plants, can protect them from harmful organisms, either by the production of substances that inhibit other microorganisms or even by their entomopathogenic activity. During the last 11 years (2007-2018) 6 endophytic isolates of maize plants were carried out in order to access their diversity, as well as to find fungi that could be used in the biological control of insect pests of maize and other plants. The present work had two main objectives: the first one was to isolate and characterize endophytic fungi from maize plants collected in Prudentópolis, PR, and to test the efficiency of entomopathogenic fungi isolated against the caterpillar *Duponchelia fovealis*, a strawberry pest. The second objective was to compile the results obtained by the LabMicro-DPAT-UFPR group over 11 years of project (2007-2018), evidencing the fungal diversity found in corn plants of different cities of Paraná. In the last isolation (2018), 20 maize plants were collected in the Municipality of Prudentópolis - PR, underwent a superficial disinfection process, cut into 1cm² fragments and deposited in 120 Petri dishes containing BDA culture medium plus streptomycin (0.4 g / ml). The plates were incubated at 28 ± 2 ° C for 30 days and the fungi were identified based on macro and micromorphology. A total of 624 fungi corresponding to the infection percentage of 100% were isolated and grouped into 80 morphogroups. It has been identified *Isaria* sp., *Beauveria bassiana*, *Drechslera* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Rhizopus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., and *Acremonium* sp. Among these isolates, the genera *Beauveria* and *Isaria* are reported as entomopathogenic in the literature, therefore 7 isolates of *Isaria* and 1 isolate of *Beauveria bassiana* were selected for the bioassay against *D. fovealis*. Ten 3rd instar caterpillars were selected and deposited in 10 strawberry leaves. Each leaf was then sprayed with the fungal suspension, at the concentration 1.0 x 10⁸ spores / ml. There were 9 treatments, 7 of them with *Isaria* sp., 1 with *B. bassiana* and 1 control. Each leaf corresponded to one replicate, totaling 10 replicates. During 7 days, the mortality of the caterpillars was evaluated and the data were submitted to an analysis of variance, followed by Tukey test, in order to show the differences between the treatments. Statically, all treatments were the same, ie,

the isolates tested were not effective in the control of *D. fovealis*. The data obtained in 6 isolates, during the 11 years of the project (2007-2018), show that the genera isolated in 11 years were: *Alternaria*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Blastomyces*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Mycelia sterilia*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Beauveria* and *Isaria*, totaling 1623 isolates. The frequencies of infection were very variable, with a mean of 57.41%, the lowest frequency being 10.8% and the highest 100%, indicating that there may be variation in the diversity and frequency of infection according to location and time of collection. These results demonstrate the diversity of the fungi found in maize, as well as their potential in the biological control of pests of important crops.

Keywords: Corn. Endophytic fungi. Entomopathogenic fungi. Biological control. European pepper moth.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1.	JUSTIFICATIVA	12
1.2.	OBJETIVOS	13
1.2.1.	Objetivo geral	13
1.2.2.	Objetivos específicos.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	MILHO	14
2.2.	INSETOS PRAGAS DO MILHO	16
2.3.	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	18
2.4.	CONTROLE BIOLÓGICO	19
2.5.	FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS	20
2.6.	MORANGUEIRO	22
2.7.	<i>Duponchelia fovealis</i>	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	25
3.2.	ISOLAMENTO FÚNGICO	26
3.3.	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	27
3.3.1.	MACROMORFOLOGIA.....	27
3.3.2.	MICROMORFOLOGIA	27
3.3.2.1.	MICROCULTIVO	28
3.4.	BIOENSAIO COM FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS	29
3.4.1.	CULTIVO DAS AMOSTRAS E SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA	29
3.4.2.	TESTE DE VIRULÊNCIA	29
3.4.2.1.	CRIAÇÃO DE <i>Duponchelia fovealis</i>	30
3.4.2.2.	ISOLADOS FÚNGICOS	30
3.4.2.3.	PRODUÇÃO DE ESPOROS	30
3.4.2.4.	PROTOCOLO DE BIOENSAIO.....	31
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.	34
3.6.	DADOS DE ISOLAMENTOS DE ENDÓFITOS DE MILHO (2007-2018) .	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1.	ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	35
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	36

4.2.1.	MACROMORFOLOGIA.....	36
4.2.2.	MICROMORFOLOGIA	47
4.3.	TESTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA SOBRE LAGARTAS DE <i>Duponchelia fovealis</i>	53
4.4.	COMPILAÇÃO DOS DADOS DE ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MILHO NO PERÍODO DE 2007 A 2018.....	58
5.	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXO 1 – TESTE ESTATÍSTICO (ANOVA E TUKEY).....	78

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) está entre as plantas de maior eficiência comercial. Pertence à família Gramineae/Poaceae cuja origem provém das Américas, havendo evidências de sua origem no México, América Central e Sudoeste dos Estados Unidos, há mais de 5000 anos. O milho foi, então, disseminado pelo mundo, sofrendo intenso processo de seleção e melhoramento. Devido à sua enorme heterogeneidade genética, o milho possui uma amplitude de adaptação a condições ecológicas diversas, podendo ser cultivado tanto nos trópicos e subtropicais como em zonas temperadas (KRUG et al, 1966).

No cenário mundial, o Brasil é o terceiro país a produzir a maior quantidade de milho, perdendo para os EUA e para a China. O milho representa a segunda maior cultura de grãos no Brasil e o Estado do Paraná é responsável pela segunda maior quantidade produzida (CONAB, 2018). Por corresponder a uma extensa área de cultivo, utilizam-se defensivos agrícolas em larga escala para eliminar pragas que afetam o milho. Esses produtos trazem malefícios para o solo e água próximos à plantação, para quem os manuseia e até mesmo para o consumidor final do grão de milho, seja na alimentação humana ou animal.

Os microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas e não prejudicam o seu hospedeiro. São amplamente distribuídos e têm sido constantemente encontrados em todas as espécies de plantas e os fungos podem habitar a superfície das plantas como epifíticos e também o interior das mesmas como endofíticos (AZEVEDO et al. 2000). São potencialmente úteis na atividade agrícola e na indústria (farmacêutica e alimentícia) (SOUZA et al, 2004). Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por patógenos, apresentam também grandes potenciais para o controle biológico (SILVA, 2013).

Para minimizar os problemas gerados pelo uso de fitossanitários, o controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos apresenta-se como alternativa, já que são capazes de colonizar e infectar o hospedeiro em diferentes estágios de vida e por não contribuir especialmente com a contaminação do meio ambiente. (WHIPPS; LUMSDEN, 1989). Nessa perspectiva, os fungos entomopatogênicos considerados de maior potencial para o controle de pragas de grãos de milho armazenados são

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (RONDELLI et al., 2012).

Em vista disso, o objetivo principal deste trabalho foi isolar fungos endofíticos de plantas de milho da região de Prudentópolis (PR) e, posteriormente, avaliar, em condições de laboratório, a eficiência de isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. no controle populacional de *D. fovealis*. Também se pretende realizar uma compilação dos dados dos últimos 11 anos (2007-2018) dos isolamentos de endófitos de milho pelo grupo do LabMicro – DPAT – UFPR.

1.1. JUSTIFICATIVA

O milho está amplamente ligado ao consumo humano e também é constantemente utilizado na fabricação de rações animais. Representa a segunda maior cultura de grãos no país e o estado do Paraná é um dos estados de maior produção. Por corresponder a uma extensa área de cultivo, utilizam-se defensivos agrícolas em larga escala para eliminar pragas que o afetam. Esses produtos trazem malefícios para o solo e água próximos à plantação, para quem os manuseia e até mesmo para o consumidor final do grão de milho, seja na alimentação humana ou animal.

Os fungos endofíticos encontrados nessas plantas podem auxiliá-las em sua defesa contra pragas e os fungos entomopatogênicos possuem a capacidade de parasitar e matar insetos, que podem ser prejudiciais em diversas culturas. Na busca de soluções mais sustentáveis, os fungos endofíticos apresentam um grande potencial no controle biológico destas e outras pragas agrícolas. A lagarta da coroa, *Duponchelia fovealis*, é uma importante praga do morangueiro, visto que ataca as folhas, flores, coroa e morangos, e os danos causados nessas plantas comprometem o crescimento, rentabilidade da fruta e a comercialização. A justificativa em utilizá-la deve-se à disponibilidade de exemplares, fornecidos pela criação do Laboratório de Parasitologia Agrícola, Prof. Ângelo Moreira da Costa Lima, do Departamento de Patologia Básica da UFPR.

Desta forma, o trabalho pretende contribuir com o conhecimento sobre a diversidade de fungos endofíticos encontrados em milho, bem como fornecer dados para que novos isolados possam ser empregados em controle biológico de pragas da agricultura.

Além disso, a compilação dos dados de isolamentos realizados no período de 2007 a 2018 fornece uma visão geral da diversidade fúngica em milho, em diferentes cidades do Paraná e como a mesma pode ser influenciada por diferentes fatores ambientais.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar a microbiota fúngica de plantas do milho e avaliar o potencial destes fungos no controle biológico de *Duponchelia fovealis*.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Isolar fungos endofíticos de plantas de milho de Prudentópolis, PR;
2. Estimar a frequência de infecção nestas plantas;
3. Avaliar a incidência e diversidade de gêneros encontrados, com ênfase para os fungos entomopatogênicos;
4. Identificar os isolados por meio de macro e micromorfologia;
5. Realizar bioensaios utilizando os fungos entomopatogênicos contra lagartas de *Duponchelia fovealis*, testando sua eficiência para o uso no controle biológico destes insetos;
6. Compilar dados de isolamentos de endófitos de milho realizados no período de 2007 a 2018, pelo grupo do LabMicro – DPAT – UFPR e fornecer dados sobre a diversidade fúngica nestas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MILHO

O milho (*Zea mays*) está entre as plantas de maior eficiência comercial. Pertence à família Gramineae/Poaceae cuja origem provém das Américas, havendo evidências de sua origem no México, América Central e Sudoeste dos Estados Unidos, há mais de 5000 anos. O milho foi, então, disseminado pelo mundo, sofrendo intenso processo de seleção e melhoramento. Devido à sua enorme heterogeneidade genética, o milho possui uma amplitude de adaptação a condições ecológicas diversas, podendo ser cultivado tanto nos trópicos e subtropicais como em zonas temperadas (KRUG et al, 1966).

No Brasil, essa cultura encontra-se altamente disseminada, uma vez que seu uso está amplamente ligado ao consumo humano ou por ser utilizado na fabricação de rações e destinado ao consumo de animais. É um dos mais importantes cereais, pois se mostra importante na comercialização nacional por ser típico de determinadas regiões (MAGALHÃES et al, 2003). No Brasil, o milho e a soja contribuem com aproximadamente 80% da produção de grãos no país. O milho tem a produção voltada para o abastecimento interno (insumo humano/animal), embora nos últimos anos a sua exportação tenha sido realizada em quantidades expressivas. Entre os anos de 2007-2010 a produção de milho aumentou e o Estado do Paraná com mais de 13 milhões de toneladas foi o maior produtor de milho, seguido pelos estados do Centro-Sul do Brasil (EMBRAPA, 2011).

Segundo Peixoto (2014), há dez anos o Brasil tinha uma produção de milho de aproximadamente 35 milhões de toneladas, numa área de 12 milhões de hectares e na atualidade passou a produzir mais de 82 milhões de toneladas em 15 milhões de hectares. O aumento do rendimento do milho é devido a vários fatores, como o potencial produtivo do genótipo e sua resistência às doenças, fertilidade do solo, densidade adequada da planta, sistema de cultivo/semeadura, o manejo de pragas e doenças e as condições ambientais (CHRISTENSEN; WILCOXSON, 1966).

A produção de milho no Brasil é dividida em duas épocas de plantio: o plantio de verão corresponde a primeira safra que ocorre em períodos chuvosos e

o segundo plantio corresponde à “safrinha”, que é plantada quase sempre após a soja precoce (DUARTE et al. CRUZ, 2007). No cenário mundial, o Brasil é o terceiro país a produzir a maior quantidade de milho, perdendo para os EUA e para a China. A China na segunda posição foi responsável por 215 milhões de toneladas na safra 2017/2018 e deve chegar em 225 milhões na safra 2018/2019, de acordo com a estimativa do USDA. Já os EUA, lideram a produção mundial com 370 milhões de toneladas na safra 2017/2018 e na safra seguinte deve sofrer uma retração ficando em 361,4 milhões de toneladas (AGÊNCIA BRASIL, 2018).

De acordo com a Conab (2018), a melhoria brasileira representa uma retomada, uma vez que o país sofreu problemas climáticos na safra anterior e outro fator que corrobora com o aumento é a ampliação do consumo que, conforme o USDA deve ir de 59,8 milhões para 65,5 milhões de toneladas entre a safra deste ano e a do ano que vem. Porém, os técnicos da Conab consideram essa projeção difícil de ser concretizada.

Já as exportações brasileiras, de acordo com a USDA, devem sair dos 27 milhões de toneladas na safra de 2017/2018 para 31 milhões na safra 2018/2019 demonstrando uma ligeira recuperação do patamar da safra 2016/2017 quando registrou 30,8 milhões de toneladas exportadas. Com relação à produção mundial de milho deve atingir em 1,054 bilhão na safra 2018/2019, com uma leve oscilação frente ao ano anterior, quando ficou em 1,033 bilhão. A estimativa é menor do que o registrado em 2016/2017, quando chegaram ao mercado 1,078 bilhão de toneladas do grão. Um dos principais vetores de ampliação é a destinação do produto para alimentação animal, alternativa que teve crescimento de 13,41% em cinco anos (AGÊNCIA BRASIL, 2018).

O milho apresenta duas safras no Brasil e, com isso, observa-se plantio e colheita simultâneos em distintas regiões brasileiras. Além dessa característica, a cultura do milho está presente em todas as Unidades da Federação. Os dois maiores estados produtores são o Mato Grosso e o Paraná. No Paraná o aumento da área de cultivo no ano de 2018 foi devido à substituição de áreas de feijão devido aos preços atrativos. O clima, embora bastante chuvoso e temperaturas um pouco baixas, foi considerado favorável à cultura. (CONAB, 2018).

2.2. INSETOS PRAGAS DO MILHO

Muitos insetos e outros animais podem se desenvolver e atingir o nível de praga em milho. As pragas podem ser agrupadas em dependentes e independentes da cultura. Aquelas são especializadas e desenvolvem-se após a emergência das plantas, ou seja, dependem do milho para realizar a postura e desenvolver suas populações. Como exemplo de pragas dependentes temos: a larva-alfinete, a lagarta-do-cartucho, a lagarta-da-espiga, a mosca-da-espiga e os pulgões (PIMENTEL, 2001). Já as independentes desenvolvem-se nas plantas cultivadas ou daninhas que precedem o milho. Algumas vezes, o milho não é o hospedeiro principal, mas devido à população presente na lavoura no momento da semeadura, podem ocorrer severos danos nas plântulas. Destacam-se como pragas as formigas, a larva-mate, os cupins, os corós, a broca-do-azeven, a lagarta-elasma, o ligeirinho, a lagarta-da-aveia, a lagarta-da-rosca, os grilos, os percevejos e as cigarrinhas (GASSEN, 1996).

A lagarta-elasma, é uma das principais pragas de milho em campo. Tem sido observada sua ocorrência com maior frequência em solos arenosos sob vegetação de cerrado e em períodos secos após as primeiras chuvas, sobretudo no primeiro ano de cultivo. Os prejuízos causados por essa lagarta ocorrem nos primeiros 30 dias após a germinação e devido ao ataque ocorrem primeiramente à morte das folhas centrais. A coró-do-milho ou pão-de-galinha é uma larva de besouro que são frequentes a partir do mês de março e abril, acometendo a época do plantio da safrinha. Neste período, as larvas desse inseto já atingiram o tamanho máximo de desenvolvimento e passam a ter uma capacidade de consumo elevado (BARROS, 2012).

Os percevejos barriga-verde são insetos sugadores que atacam as plantas introduzindo o aparelho bucal na planta hospedeira retirando destas a seiva para a sua própria nutrição. Há duas espécies de percevejos conhecidos por barriga-verde na cultura do milho safrinha *Dichelops furcatus* e *Dichelops melacanthus* (Dallas). Esses insetos estão nos solos, devido ao hábito de permanecerem na palhada, atacando as plântulas de milho e ocasionando pequenas perfurações. Ao passo em que as plantas se desenvolvem, a lesão aumenta formando áreas necrosadas no sentido transversal da folha, podendo esta dobrar na região danificada. Como

resultado do dano, as plantas de milho ficam com o desenvolvimento comprometido, apresentando um aspecto popularmente chamado de "encharutamento". Os moluscos filófagos, nesse caso os caracóis, têm ocorrido com grande abundância nas lavouras devido a grande cobertura vegetal existente nos solos. A sua alta proliferação é devido a ambientes de temperatura amena e alta umidade do solo e ar, encontrando em lavouras de plantio direto condições favoráveis para seu abrigo e reprodução. No sul do país foram identificados os caracóis do gênero *Bulimulus spp.* (Mollusca, Bulimulidae), sendo estes os prováveis causadores de danos também em lavouras da região Centro Sul de Mato Grosso do Sul. Atacam normalmente a parte aérea das plantas raspando com a língua áspera o tecido vegetal, podendo causar desfolha semelhante à de insetos mastigadores, (BARROS, 2012).

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*, é a principal praga do milho no Brasil e os prejuízos por esta causada depende do estágio em que a planta se encontra na ocasião do ataque. Sendo assim, até os 30 dias de desenvolvimento da cultura podem ser esperados prejuízos da ordem de 15 %, já no florescimento podem chegar a 34%. As larvas de primeiro ínstar geralmente consomem o tecido verde de um lado da folha, deixando intacta a epiderme membranosa do outro lado. Essa lagarta também pode danificar a lavoura de milho de forma semelhante a lagarta-elasma e lagarta-rosca. A larva entra pela base da planta e alimenta-se do interior do colmo pouco desenvolvido. Em plantas maiores pode ocorrer o seccionamento total ou parcial do colmo, matando a planta semelhantemente ao ataque de lagarta-rosca. Geralmente este tipo de dano é provocado por lagartas mais desenvolvidas. Outro ataque comum dessa lagarta é o dano causado às espigas do milho. Este tipo de prejuízo tem sido verificado com mais frequência em híbridos de milho de ciclo mais curto, caracterizados pela rápida emissão do pendão (BARROS, 2012).

As lagartas-das-espigas *Helicoverpa zea*, à medida que elas se desenvolvem, penetram no interior da espiga e iniciam a destruição dos grãos em formação. Broca da cana *Diatraea saccharalis*, na fase adulta corresponde a uma mariposa de coloração amarelo palha. As lagartas atacam os cartuchos e se danos forem superficiais, resultam na formação de uma série de furos transversais na lâmina foliar, semelhante ao dano "leve" causado pelo percevejo barriga-verde. Todavia, em plantas de milho mais desenvolvidas, as lagartas, geralmente de 3º ínstar, penetram

no colmo onde fazem galerias ascendentes enfraquecendo a planta. A capacidade de dano médio da praga pode resultar em perdas de 21 a 27% no rendimento de grãos, no entanto, prejuízos maiores podem ocorrer, principalmente se o ataque ocorrer nos entrenós próximos à espiga, o que provavelmente afeta a relação fonte/dreno da planta (BARROS, 2012).

O pulgão-do-milho *Rhopalosiphum maidis* é um inseto sugador de seiva do floema que formam colônias. Os danos causados pelo pulgão-do-milho estão relacionados com a sucção contínua da seiva das plantas e, além disso, são vetores de viroses, podendo transmitir o vírus do mosaico comum do milho. O tripses do milho *Frankliniella williamsi* é um inseto raspador-sugador de seiva. É uma praga bastante favorecida por veranicos (pouca umidade e altas temperaturas) provavelmente devido a aspectos relacionados também à concentração dos fotoassimilados nas células vegetais, à semelhança do ocorrido com o pulgão-do-milho (BARROS, 2012).

2.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS

Microrganismos endofíticos são organismos que habitam o interior das plantas e não prejudicam o seu hospedeiro. Entretanto, um endófito que viva no interior do hospedeiro, de acordo com as condições ambientais/estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente (AZEVEDO, 1998).

Os endófitos de partes aéreas dos vegetais possuem potencial na produção de metabólitos de interesse econômico (SOUZA et al, 2004). As interações entre esses organismos podem ser: simbióticas, neutras ou antagônicas. Relações simbióticas produzem/induzem a produção de algum tipo de metabólito primário/secundário que podem conferir algum tipo de vantagem à planta (SOUZA et al, 2004). Em outros casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas, aumento de área foliar e maior número de ramificações e maior tolerância ao ataque de insetos (CLAY, 1987).

Esses endófitos são potencialmente úteis na atividade agrícola e indústria (farmacêutica e alimentícia) (SOUZA et al, 2004). “Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por patógenos, apresentam também grandes potenciais para o controle biológico” (SILVA, 2013).

2.4. CONTROLE BIOLÓGICO

Atualmente, o uso de compostos químicos sintéticos tem sido o principal meio de controle de pragas, doenças e plantas invasoras. Entre os principais estão os inseticidas e fungicidas, porém muitos destes produtos são tóxicos ao homem e aos animais, além de reduzirem o potencial de controle de pragas por predadores, parasitóides e entomopatógenos (ALVES et al. 1998a).

O uso inadequado desses produtos pode ocasionar falhas durante o processo de controle de pragas, que culmina na elevação dos custos, maior presença de resíduos químicos nos grãos e o rápido desenvolvimento de resistência por parte das espécies que estão expostas continuamente a estas aplicações fitossanitárias (RIBEIRO et al., 2003; DAGLISH, 2004)

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Brasil é responsável por 1/5 do consumo mundial de agrotóxicos, usando 19% dos agrotóxicos produzidos no mundo. Anualmente são usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. No Brasil o consumo anual tem sido superior a 300 mil toneladas. Nos últimos quarenta anos, houve um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% enquanto a área agrícola aumentou 78% no mesmo período. Esses dados preocupam os diversos segmentos da sociedade e têm levado à uma demanda crescente por alternativas que atendam às restrições ambientais e às exigências dos consumidores. O controle biológico, inserido no manejo integrado de pragas, é uma das opções para atender aos anseios da sociedade na busca constante por soluções sustentáveis (EMBRAPA)

Para amenizar esses problemas, o controle biológico com microrganismos entomopatogênicos entra como uma opção viável e vantajosa, especialmente quanto à redução do impacto ambiental e contaminação do produto com resíduos, maior segurança para sua manipulação, menor custo de aplicação e especificidade e também por não selecionar populações resistentes de pragas e não ocasionar problemas qualitativos e quantitativos aos grãos armazenados (FRANCESCHINI, 2001), representados principalmente pelos grupos de fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, rickétsias e micoplasma (ALVES, 1998). Podem ser utilizados sozinhos ou integrados com outros métodos, como os inseticidas naturais de origem vegetal, feromônios, variedades de plantas resistentes a insetos, etc (LOURENÇÃO et al., 1993).

“O controle biológico é um fenômeno natural e consiste na regulação do número de plantas e animais pelos agentes biológicos de mortalidade (inimigos naturais). O elemento principal dentro do controle natural, que mantém todas as criaturas (com exceção, possivelmente, do ser humano) em estado de equilíbrio com seu ambiente. O controle biológico engloba tanto a introdução quanto à manipulação dos inimigos naturais pelo homem para o controle de pragas (aplicado), bem como o controle sem a intervenção humana (natural). Os inimigos naturais de insetos são, às vezes, chamados de "organismos benéficos", ou simplesmente "benéficos". Eles são classificados em predadores, parasitoides e patógenos.”¹

2.5. FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos entomopatogênicos tem a capacidade de infectar um número grande de espécies pragas em todas as fases da vida, com exceção dos ovos e também podem se manter no ambiente pelo desenvolvimento de epizootias naturais (ALVES, 1998). São fungos que não precisam ser ingeridos para infectar o hospedeiro, uma vez que os seus conídios têm a capacidade de penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto (HAJEK; LEGER, 1994). É um processo de infecção complexo que envolve penetração mecânica, produção de enzimas e a superação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LEGER, 1995; ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI, 2013). No período de colonização, o fungo se multiplica na hemolinfa do inseto formando uma massa hifal capaz de levar o hospedeiro à morte devido ao esgotamento de seus nutrientes (LAZZARINI, 2005).

O russo Metschnikoff no final do século XIX realizou os primeiros testes com fungos que infectam insetos para avaliar o potencial de *Metarhizium anisopliae* para o controle de um besouro. Porém, apenas depois de um século os resultados práticos começaram a surgir e a comercialização de vários inseticidas biológicos a base de fungos começaram a ser disponibilizados (FARIA et al, 2001).

De acordo com BLACKWELL (2010), são conhecidas mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos e a maioria delas estão contidas nos filos Ascomycota (ordem Hypocreales) e Entomophthoromycota. Os fungos da ordem Hypocreales anamórficos são considerados patógenos generalistas, visto que infectam uma ampla gama de hospedeiros, enquanto que os Entomophthorales são específicos (BLACKWELL, 2010; ALVES, 1998).

Uma característica marcante do filo Ascomycota diz respeito à presença de

¹ FILHO, I. A. P.; R, J. A. S. **Sorgo. O produtor pergunta, a Embrapa responde.** Embrapa, Brasília DF 2015.

hifas septadas as quais se diferenciam em células conidiogênicas, conidióforos ou fiáldes e os conídios que correspondem às estruturas de reprodução assexuadas desses fungos. A dispersão dos conídios ocorre pelo vento, chuva ou por algum hospedeiro. A ordem Hypocreales têm três famílias de fungos entomopatogênicos: Cordycipitaceae com os gêneros de maior importância agrícola, *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium* e *Simplicillium*, Clavicipitaceae com os gêneros *Metarhizium*, *Aschersonia* e *Pochonia* e Ophicordycipitaceae com *Hirsutella* e *Syngliocladium* (HUMBER, 2012).

Dentre os fungos entomopatogênicos da família Cordycipitaceae os gêneros *Isaria* e *Beauveria* se destacam por promoverem epizootias naturais em lepidópteros, coleópteros, hemípteros e ortópteros (ALVES, 1998). O fungo *Beauveria bassiana* pode ocorrer, na natureza, em mais de 200 espécies de insetos e ácaros (ALVES, 1998a). Em 2011 foi relatada a ocorrência natural do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* Vuill. (Ascomycetes: Clavicipitacea) em exemplares de *Thaumastocoris peregrinus* no estado do Paraná (LORENCETTI et al., 2017). Com relação aos hemípteros, *Beauveria bassiana* promove infecção sobre o percevejo-do-grão, *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) (SANTOS et al., 2002), o percevejo-castanho-daraiz, *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae) (XAVIER; ÀVILA, 2005), a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (FARIA; WRIGHT, 2001; POTRICH et al., 2011), o percevejo *Collaria scenica* (Stal, 1859) (Hemiptera: Miridae) (BARBOZA et al., 2011), o percevejode-renda-da-mandioca *Vatiga manihotae* (Drake) (Hemiptera: Tingidae) (ALVES et al., 2012).

Vários estudos têm relatado a eficiência de *Isaria* spp. no controle biológico. Sobre hemípteros tem-se ação comprovada sobre a pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) (LOPES et al., 2008), mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) (POTRICH et al., 2011) e *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae) (MUSTU; DEMIRCI; KOÇAK, 2011). Esse fungo apresenta elevada virulência sobre ninfas e adultos de diversos insetos após a pulverização direta de conídios ou blastóporos (PATT et al., 2015; CONCESCHI et al., 2016).

B. bassiana pode persistir no solo por períodos de 15 dias a 1 ano, após a liberação (WATT; LEBRUN, 1984; MÜLLER-KÖGLER; ZIMMERMAN, 1986). Thor Wilson et al. (1985) e Daoust e Pereira (1986) observaram que *B. bassiana* tem

persistência de 32 semanas em cadáveres hospedeiros. Esse mesmo fungo foi testado para o controle de diversos cerambicídeos em Kentucky nos Estados Unidos, atingindo porcentagens de mortalidade superiores a 60% (FORSCHLER; NORDIN, 1988). Já na China, *B.bassiana* foi e tem sido produzido em larga escala e utilizado no controle de mais de 30 espécies de pragas florestais e agrícolas (FENG et al., 1994).

Para que haja sucesso na utilização dos fungos entomopatogênicos é necessária à compreensão entre a interação patógeno-hospedeiro. Entretanto, há poucas informações disponíveis sobre as toxinas produzidas pelas espécies de *Isaria* (ZIMMERMANN, 2008). A primeira toxina relacionada a *I. fumosorosea* relatada foi a beauvericina (BERNARDI et al., 1975; PEETERS et al., 1983), um importante metabólito produzido também pelo fungo *Beauveria bassiana*. A produção de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases de forma sequencial foi constatada quando isolados de *I. fumosorosea* foram cultivados em meio de cultura líquido contendo quitina (ALI et al., 2010).

2.6. MORANGUEIRO

O morangueiro (*Fragaria X ananassa Duch.*) pertence à família Rosaceae e é uma planta rasteira propagada por estolhos (RESENDE et al., 1999). No Brasil, os principais estados produtores desta planta são Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Distrito Federal e Goiás. Os elementos micrometeorológicos e as práticas de manejo influenciam a produtividade e a qualidade dos frutos. Dessa forma, os cultivares de morangueiro diferenciam-se de acordo com a adaptação regional. Dessa forma, um cultivar pode se desenvolver satisfatoriamente em um local e em outro não, devido às condições ambientais. (UENO, 2004).

No Brasil, o Paraná é o quinto maior produtor de morangos e no país são destinados 4.300 hectares que no final geram 160 mil toneladas de morango. A produtividade de 35 toneladas por hectare gera a rentabilidade de R\$180 mil (bruto) (BEM PARANÁ, 2018). O interesse por esse fruto é devido à elevada rentabilidade, amplo conhecimento e aceitação pelo consumidor e pela diversidade de opções de comercialização e processamento do morango (SANHUEZA et al., 2005).

Os problemas fitossanitários no morangueiro são de difícil controle, necessitando constante monitoramento a fim de evitar suas disseminações. Este manejo é consequência de um mercado que exige um padrão de frutos livres de defeitos que somente é alcançado com um alto custo energético embutido nos insumos utilizados no controle (FADINI et al., 2004). Dessa forma, a ocorrência de diversas doenças e pragas tem estimulado o produtor a buscar novas técnicas de cultivo e novas cultivares. Uma das opções tem sido o emprego intensivo de agrotóxicos e isso tem estimulado produtores, extensionistas e pesquisadores a testarem sistemas de produção menos impactantes, como o de produção orgânica e cultivo sem solo (RANDIN et al., 2011).

2.7. *Duponchelia fovealis*

Duponchelia fovealis (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae) originária da região mediterrânea e Ilhas Canárias, conhecida popularmente como mariposa, é uma enorme praga do morangueiro na Europa e Ásia. No Brasil, trata-se de uma espécie exótica e em importantes regiões produtoras de morangueiro houve uma grande taxa de ocorrência e dispersão da mesma (ZAWADNEAK et al. 2011, 2014; FORNAZIER et al. 2011; SOUZA et al. 2013). As larvas atacam folhas, flores, coroa e morangos (EFIL et al. 2014; ZAWADNEAK et al. 2016).

Os danos causados nas plantas comprometem o seu crescimento e favorecem a entrada de fitopatógenos. Ao ficarem debilitadas, podem morrer. A forma como a praga ingressou no Brasil não é conhecida, podendo ter sido introduzida com material propagativo de plantas ornamentais (das quais é praga importante na Europa) (ZAWADNEAK et al. 2015, 2016).

“Os adultos medem em torno de 19mm de envergadura das asas por 10mm de comprimento. 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. Os ovos são de coloração creme, medindo em média 0,3mm x 0,6mm de largura e comprimento, respectivamente, com formato elíptico. Os ovos podem ser depositados de forma isolada ou em grupo de três a dez unidades. Quando próximos à eclosão são de coloração avermelhada. As lagartas são de coloração branco-creme a marrom-claro, medem

aproximadamente 20mm de comprimento no último instar. A cabeça é de cor marrom-escuro, com manchas escuras no corpo.”²

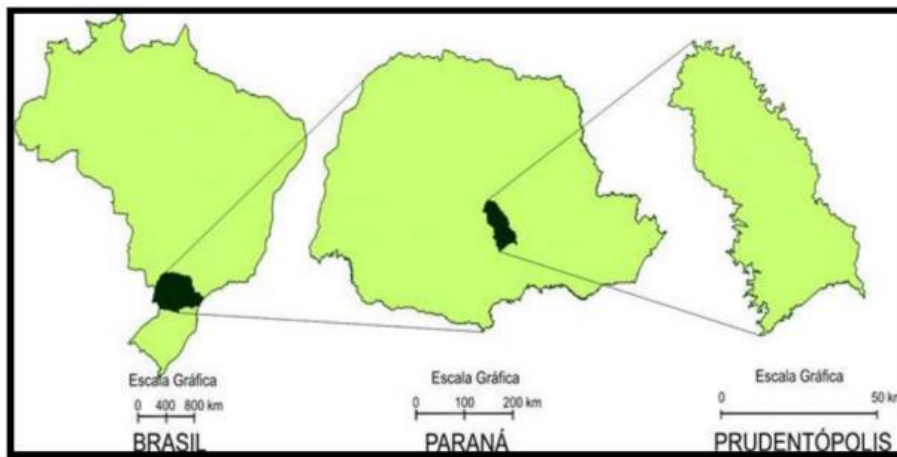
² ZAWADNEAK, MAC; GONÇALVES, RB; KUHN, TM; ARAÚJO, ES; DOLCI, E .; ROCHA, CS; SANTOS, B; BENATTO, A .; VIDAL, HR 2011. *Novo desafio. Cultivar HF* 8/9: 24-26

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de folhas de milho foram coletadas na cidade de Prudentópolis (FIGURA 1), Paraná e o cultivo dessas plantas foram feitas sem a utilização de defensivos químicos. Foram selecionadas 20 plantas de milho (FIGURA 2) sadias e jovens com aproximadamente 30 cm de altura e destas, foram coletadas duas folhas, totalizando 40.

FIGURA 1 – MAPA DO MUNICÍPIO DE PRUDENTÓPOLIS.



FONTE: Site da prefeitura, 2015.

FIGURA 2 – CULTIVO DE PLANTAS DE MILHO NO MUNICÍPIO DE PRUDENTÓPOLIS – PR.



FONTE: O autor (2018).

3.2. ISOLAMENTO FÚNGICO

Os fungos foram isolados de plantas jovens e sadias seguindo a metodologia descrita por PIMENTEL (2001). Após a coleta, o material foi lavado em água corrente e em seguida cada uma das extremidades das folhas foi vedada com parafina derretida para impedir que os produtos utilizados na desinfecção externa penetrassem nos tecidos.

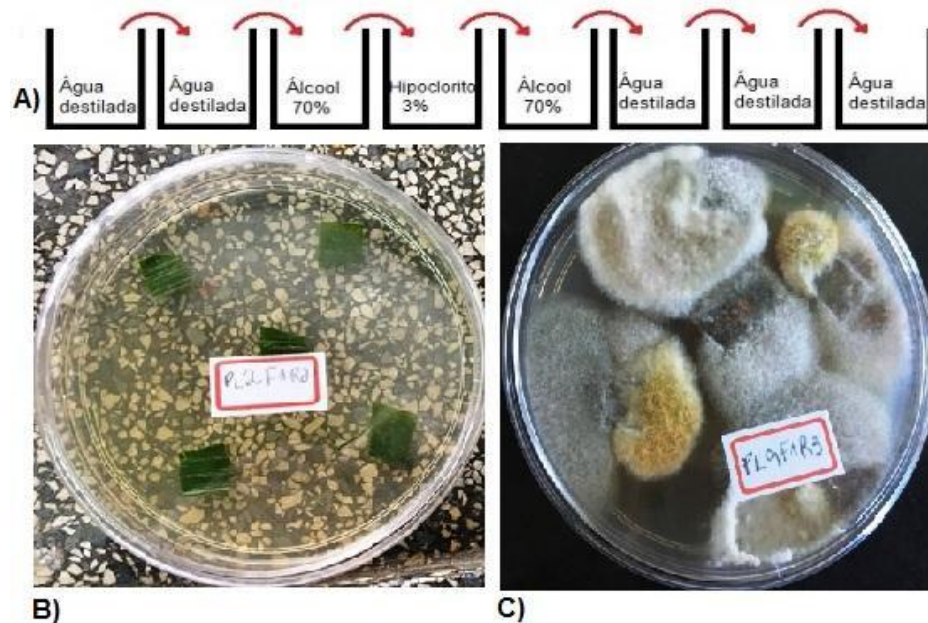
Inicialmente as folhas foram submersas por duas vezes em água destilada esterilizada, um minuto em etanol 70%, 4 minutos em hipoclorito de sódio 3%, 30 segundos em etanol 70% e depois lavados 3 vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto (FIGURA 3A).

Finalizada a esterilização externa, as folhas foram cortadas em 5 fragmentos (5-7mm) e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescidos de estreptomicina (0,4g/ml) com a parte adaxial da folha virada pra cima e incubados a 28°C por 30 dias e observados diariamente para a verificação do aparecimentos dos isolados (FIGURA 3B,C). A identificação dos isolados consistiu em um código alfanumérico que representa o fragmento do qual ele é proveniente, contendo uma letra inicial "PL", com o número da planta, seguido da letra "F", com o número da folha e da repetição e por fim, a letra do fragmento originário e número por ordem de aparecimento. Após o crescimento foram transferidos para tubos inclinados com meio BDA e incubados a 28°C e mantidos a 4°C.

O cálculo da frequência de infecção (FI) é determinado após o final do isolamento e é avaliado o número de fragmentos em que apareceram crescimento de microrganismos em relação ao número total de fragmentos avaliados (AZEVEDO *et al.*,2010).

$$\text{Frequência de infecção} = \frac{\text{Número de fragmentos contendo um ou mais fungos}}{\text{número total de fragmentos}} \times 100$$

FIGURA 3 - A) ETAPAS DA DESINFECÇÃO SUPERFICIAL DA FOLHA. B) FRAGMENTOS CORTADOS E DEPOSITADOS EM PLACAS CONTENDO MEIO DE CULTURA BDA E ANTIBIÓTICO. C) CRESCIMENTO DE ISOLADOS APÓS INCUBAÇÃO A 28°C.



FONTE: O autor (2018)

3.3. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

3.3.1. MACROMORFOLOGIA

A macromorfologia consiste na identificação de características macroscópicas expressas pelos isolados. Os fungos filamentosos são conhecidos como bolores e podem ser caracterizados a partir da inspeção visual. As características avaliadas consistem no tipo de texturas (algodonosos, aveludados, pulverulentos), aspecto da colônia (seco, úmido ou opaco), coloração e se os bordos são inteiros ou regulares. Todos os exemplares foram semeados em tubos com meio ágar batata dextrose (BDA) e armazenados em BOD por pelo menos 7 dias, a $28 \pm 0,5$ °C. Após essa etapa, foram classificados.

3.3.2. MICROMORFOLOGIA

Após a divisão em morfotipos, realizou-se a técnica microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999) para cada grupo e as identificações foram realizadas pela presença de estruturas reprodutivas.

3.3.2.1. MICROCULTIVO

A técnica do microcultivo (KERN; BLEVIS 1999) permite a visualização de estruturas de reprodução, porém depende da velocidade de crescimento fúngico, a que pode ser rápida (+/- 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (>15 dias).

Um exemplar de cada um dos 80 grupos isolados das folhas do milho foi submetido a esta técnica. Em uma placa de Petri esterilizada com uma lâmina contida em seu interior colocaram-se dois cubos (1cm x 1cm) de meio BDA camada alta nas extremidades da placa e o fungo foi inoculado nos 4 lados de cada cubo e posteriormente recobertos com uma lamínula em cada cubo (FIGURA 4).

No interior da placa, também se adicionou um algodão úmido para evitar a dessecação do meio durante o tempo de incubação em uma BOD a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, que variou entre 7-14 dias. Depois, retirou-se a primeira lamínula no 7º dia e a segunda no 14º dia. Ambas foram colocadas sobre uma lâmina contendo uma gota de corante Lactofenol de Amann, e vedadas em seguida com esmalte incolor nas bordas para a observação em microscópio ótico.

FIGURA 4 - TÉCNICA DO MICROCULTIVO À ESQUERDA E À DIREITA COM O ISOLADO SEMEADO NOS CUBOS EM MEIO BDA.



FONTE: O autor (2018)

3.4. BIOENSAIO COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

3.4.1. CULTIVO DAS AMOSTRAS E SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA

Para a realização do bioensaio, utilizaram-se fungos endofíticos identificados pela técnica do microcultivo e que, de acordo com a literatura, possuíam algum potencial entomopatogênico: *Isaria sp.* e *B. bassiana*. Os isolados foram cultivados em meio ágar-níger, excelente meio de cultivo para o crescimento e esporulação destes fungos (FIGURA 5).

Para cada isolado com potencial entomopatogênico foram feitas três placas de meio ágar-níger (100 g de níger cozinhado por 10 minutos em 1L de água destilada, 18g de ágar e 1g de glicose) (POITEVIN et al. 2018) que foram armazenadas em BOD a $28\pm 1^\circ\text{C}$ por quatorze dias.

FIGURA 5 - *ISARIA* E *BEAUVERIA* CRESCIDOS EM MEIO ÁGAR-NIGER POR 14 DIAS MANTIDOS EM BOD A $28\pm 1^\circ\text{C}$.



FONTE: O autor (2018)

3.4.2. TESTE DE VIRULÊNCIA

3.4.2.1. CRIAÇÃO DE *Duponchelia fovealis*

As lagartas de 3º instar de *D. fovealis* (FIGURA 6) são provenientes do laboratório Prof. Ângelo Moreira da Costa Lima, localizado no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná. São armazenadas em salas climatizadas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h) com dieta artificial.

FIGURA 6 - LAGARTAS DE 3º INSTAR DA CRIAÇÃO PROF. ÂNGELO MOREIRA DA COSTA LIMA



FONTE: O autor (2018).

3.4.2.2. ISOLADOS FÚNGICOS

Os fungos endofíticos utilizados no teste de virulência contra *D. fovealis* foram isolados das folhas de milho. Foram utilizados 8 isolados: *Beauveria bassiana* (PL16F2R1-A1) e *Isaria* sp. (PL14F1R3-A1, PL12F1R1-C4, PL7F1R2-C2, PL12F1R1-B4, PL5F1R2-E1, PL16F1R2-B2 e PL5F1R2-D1).

3.4.2.3. PRODUÇÃO DE ESPOROS

Para a produção de esporos os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio níger e incubados em câmara BOD a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por quatorze dias. A retirada de esporos das placas foi feita por meio de uma raspagem com uma espátula e estes transferidos para um frasco contendo solução salina 0,85% e homogeneizados em vortex à temperatura ambiente e transferidos para câmara de Neubauer para a contagem dos esporos.

3.4.2.4. PROTOCOLO DE BIOENSAIO

O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia –LabMicro na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil e seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com 9 tratamentos e 10 repetições (QUADRO 1).

QUADRO 1 - DADOS DOS TRATAMENTOS UTILIZADOS NO BIOENSAIO.

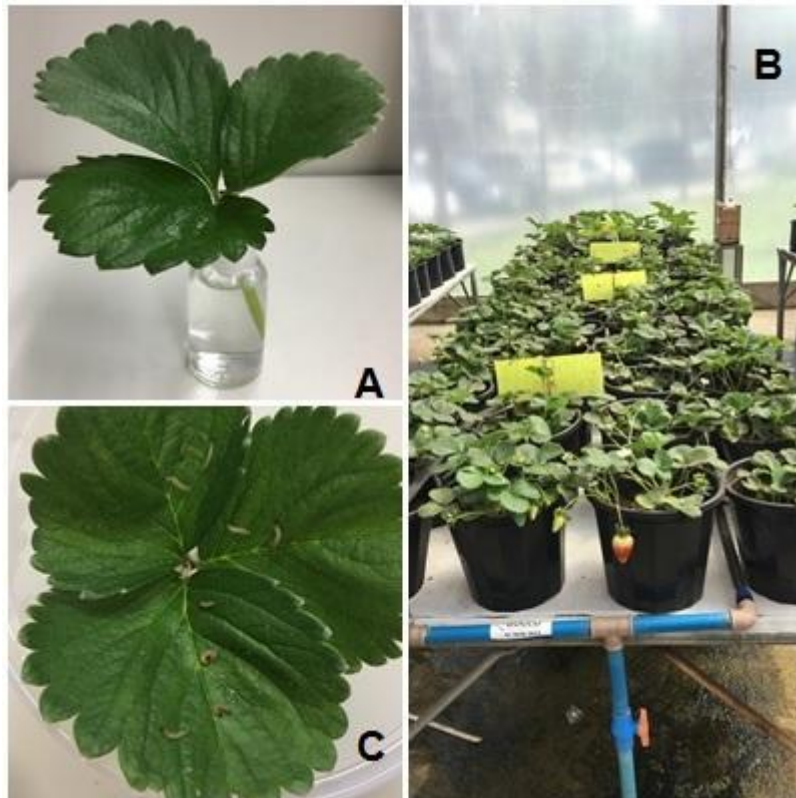
Tratamentos	Fungos utilizados (10 ⁸ esporos/mL)	Repetições (número de folhas)	Número de lagartas/folha
A	<i>Controle - Solução salina 0,85% + tween 80</i>	10	10
B	<i>Beauveria bassiana</i> (PL16F2R1-A1) + solução salina 0,85% + tween 80	10	10
C	<i>Isaria sp.</i> (PL14F1R3-A1) + solução salina 0,85% + tween 80	10	10
D	<i>Isaria sp.</i> (PL12F1R1-C4) + solução salina 0,85% + tween 80	10	10
E	<i>Isaria sp.</i> (PL7F1R2-C2)+ solução salina 0,85% + tween 80	10	10
F	<i>Isaria sp.</i> (PL12F1R1-B4)+ solução salina 0,85% + tween 80	10	10
G	<i>Isaria sp.</i> (PL5F1R2-E1)+ solução salina 0,85% + tween 80	10	10
H	<i>Isaria sp.</i> (PL16F1R2-B2)+ solução salina 0,85% + tween 80	10	10
I	<i>Isaria sp.</i> (PL5F1R2-D1)+ solução salina 0,85% + tween 80	10	10

FONTE: o autor (2018).

O bioensaio foi realizado com oito fungos endofíticos e um grupo controle, totalizando 9 tratamentos. Somente lagartas de 3^o ínstar foram selecionadas e com auxílio de pincéis finos foram transferidas para folhas de morangueiro (FIGURA 7A) cultivadas em estufa (FIGURA 7B). No total, foram utilizadas 90 folhas, 10 por tratamento, compondo 10 repetições, e em cada uma das folhas foram depositadas dez lagartas (FIGURA 7C). Em seguida, as folhas contendo as lagartas foram pulverizadas com 1 mL das diferentes suspensões fúngicas (FIGURA 8) que

consistem nos tratamentos listados no QUADRO 1, preparadas em solução salina 0,85% + tween 80, na concentração 10^8 esporos/mL. No grupo controle utilizou-se solução salina 0,85% + tween 80. Depois, as folhas foram armazenadas no laboratório Prof. Ângelo Moreira da Costa (FIGURA 9), em salas climatizadas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h) e as avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente por sete dias. Como critério de mortalidade utilizou-se a não resposta do inseto ao toque do pincel. Ao constatar a morte, foram colocados em placa de Petri estéril com um algodão úmido e incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ para a exteriorização do fungo.

FIGURA 7 - A. FOLHA DE MORANGUEIRO COLETADA. B. ESTUFA DE MORANGO. C. FOLHA DE MORANGUEIRO COM 10 LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR.



FONTE: O autor (2018)

FIGURA 8 - SUSPENSÕES FÚNGICAS EM SOLUÇÃO SALINA 0,85% + TWEEN 80.



FONTE: O autor (2018)

FIGURA 9 - ARMAZENAMENTO DO EXPERIMENTO NA CRIAÇÃO PROF. ÂNGELO MOREIRA DA COSTA.



FONTE: O autor (2018)

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos (*Beauveria bassiana*; *Isaria sp.*; solução salina) e 10 repetições. Foi realizada uma análise de variância a 0,01% e o Teste de Tukey para comparação das médias. O software utilizado foi o SISVAR versão 5.6.

3.6. DADOS DE ISOLAMENTOS DE ENDÓFITOS DE MILHO (2007-2018)

Durante o período de 2007-2018 foram realizados 6 isolamentos de endófitos de milho pelo grupo do LabMicro – DPAT – UFPR, em 4 cidades do Paraná: Palotina (2007), Curitiba (2011, 2015 e 2016), Cascavel (2013) e Prudentópolis (2018). Os dados obtidos nestes isolamentos foram compilados, a fim de fornecer dados sobre as frequências de infecção e a diversidade fúngica em milho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Após o isolamento e a incubação de 600 fragmentos das folhas de milho, foram obtidos 624 isolados (FIGURA 10). Dessa forma, com a obtenção do número total de amostras foi possível calcular a frequência de infecção que consiste na seguinte fórmula:

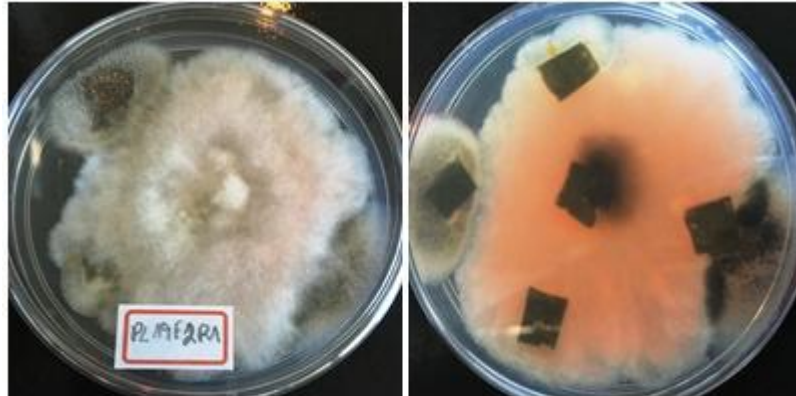
$$\text{Frequência de infecção} = \frac{\text{Número de fragmentos contendo um ou mais fungos}}{\text{número total de fragmentos}} \times 100$$

Foram obtidos 600 fragmentos e de todos foram extraídos fungos. Sendo assim, a frequência de infecção foi calculada como sendo:

$$\text{Frequência de infecção} = 600/600 \times 100 = 100\%$$

Em trabalhos anteriores realizados também com folhas de milho e no LabMicro-DPAT-UFPR (não publicados), sob as mesmas condições, as percentagens de infecção variaram muito. No ano de 2007, a porcentagem de infecção correspondeu a 31%, em 2011 a 10,8%, em 2013 a 65,6%, em 2015 a 37,08%, e em 2016 e 2018 atingiu 100%. Tal resultado pode ser explicado devido às diferenças nas condições de cultivo da planta, influência da sazonalidade, do tipo da planta e da localização da mesma, sugerindo que uma série de fatores está envolvida na colonização dos tecidos da mesma por fungos endofíticos.

FIGURA 10 - EXTERIORIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE MILHO EM MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO A 28°C.



FONTE: O autor (2018)

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.2.1. MACROMORFOLOGIA

Para a identificação dos 624 isolados, estes foram crescidos em tubos inclinados contendo meio BDA e depois foram separados de acordo com a morfologia resultando no agrupamento de 80 morfotipos (QUADRO 2) (FIGURA 11). Porém, nem todos os isolados apresentaram características semelhantes o suficiente para serem agrupados entre si. Após o agrupamento, um isolado de cada grupo foi selecionado para a realização do microcultivo.

QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DOS MORFOGRUPOS FÚNGICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO.

GRUPO	Nº ISOLADOS	DESCRIÇÃO
1	8	VERSO: bordos negros com crescimento regular nas pontas nas cores cinza, algodonoso no centro na cor cinza e manchas brancas e com aspecto seco. REVERSO: bordos escuros regulares, superfície lisa escura.
2	28	VERSO: bordos negros com crescimento regular, superfície lisa na coloração cinza esverdeado com aspecto seco e opaco. REVERSO: bordos negros, superfície lisa de cores escuras.
3	1	VERSO: bordos irregulares de coloração mesclada (preto e branco), superfície rugosa com protuberâncias brancas e de aspecto seco. REVERSO: pigmentado com protuberâncias escuras.
4	2	VERSO: bordos regulares, textura algodonosa nos tons cinza e branco e de aspecto úmido. REVERSO: totalmente escuro e liso.

5	5	<p>VERSO: bordos regulares, superfície algodouosa em tons claros e de aspecto seco.</p> <p>REVERSO: totalmente liso e escuro.</p>
6	4	<p>VERSO: bordos regulares, textura algodouosa em cores difusas.</p> <p>REVERSO: liso na cor marrom.</p>
7	6	<p>VERSO: bordos regulares, coloração cinza-esverdeado de aspecto opaco.</p> <p>REVERSO: liso e predominante marrom com outros tons mais claros.</p>
8	11	<p>VERSO: bordos regulares de coloração preto, textura algodouoso em tons cinza e de aspecto seco e opaco.</p> <p>REVERSO: liso em tons escuros.</p>
9	6	<p>VERSO: bordos escuros regulares, algodouoso de coloração variando entre cinza, branco e preto com aspecto seco e opaco.</p> <p>REVERSO: liso e escuro.</p>
10	15	<p>VERSO: bordos regulares predominante na cor cinza, tendo como cores secundárias brancas e pretas, textura algodouosa com protuberâncias pretas.</p> <p>REVERSO: liso, claro e protuberâncias pretas.</p>
11	5	<p>VERSO: bordos regulares de coloração escura, regiões com aspecto úmido e outras secas, textura algodouosa em tons brancos, cinzas, verde e protuberâncias pretas.</p> <p>REVERSO: liso, tons de marrom e poucas protuberâncias pretas.</p>
12	4	<p>VERSO: bordos regulares, textura algodouosa de coloração mesclada entre branco, cinza e de aspecto seco.</p> <p>REVERSO: incolor com protuberâncias pretas.</p>
13	26	<p>VERSO: bordos regulares de cor preta, textura algodouosa em tons de cinza, preto e branco com crescimento irregular e de aspecto seco e opaco.</p> <p>REVERSO: incolor com partes castanhas.</p>
14	4	<p>VERSO: bordo regular, textura algodouosa em tons cinzentos.</p> <p>REVERSO: liso em cores claras.</p>
15	4	<p>VERSO: bordos regulares, textura algodouosa com cores variadas (laranja, rosa, marrom, amarelo, cinza).</p> <p>REVERSO: pigmentado e castanho claro.</p>
16	18	<p>VERSO: bordo regular na cor preta, textura algodouosa em tons cinzas e de aspecto opaco.</p> <p>REVERSO: preto e extremidades claras.</p>
17	24	<p>VERSO: bordos irregulares, crescimento irregular da colônia que tem colorações variando de cinza claro a escuro, branco e preto. O crescimento irregular da colônia aparenta arvorezinhas pequenas.</p> <p>REVERSO: bordos irregulares que parecem algas e coloração escura.</p>
18	5	<p>VERSO: bordos regulares, pulverulento de cor marrom escuro.</p> <p>REVERSO: totalmente escuro.</p>
19	2	<p>VERSO: bordos regulares de coloração preta, cores escuras no centro com alguma pigmentação (amarela e laranja).</p> <p>REVERSO: escuro e produziu alguma pigmentação que alterou o meio tornando-o amarelado esverdeado.</p>
20	1	<p>VERSO: bordo irregular preto parecendo um tapete desfiado, coloração marrom clara.</p> <p>REVERSO: bordo irregular preto, textura manchada.</p>
21	2	<p>VERSO: aspecto pulverulento de colorações pastéis.</p> <p>REVERSO: castanho.</p>
22	6	<p>VERSO: aspecto seco de coloração branca e cinza com protuberâncias pretas.</p> <p>REVERSO: castanho com bordas claras.</p>

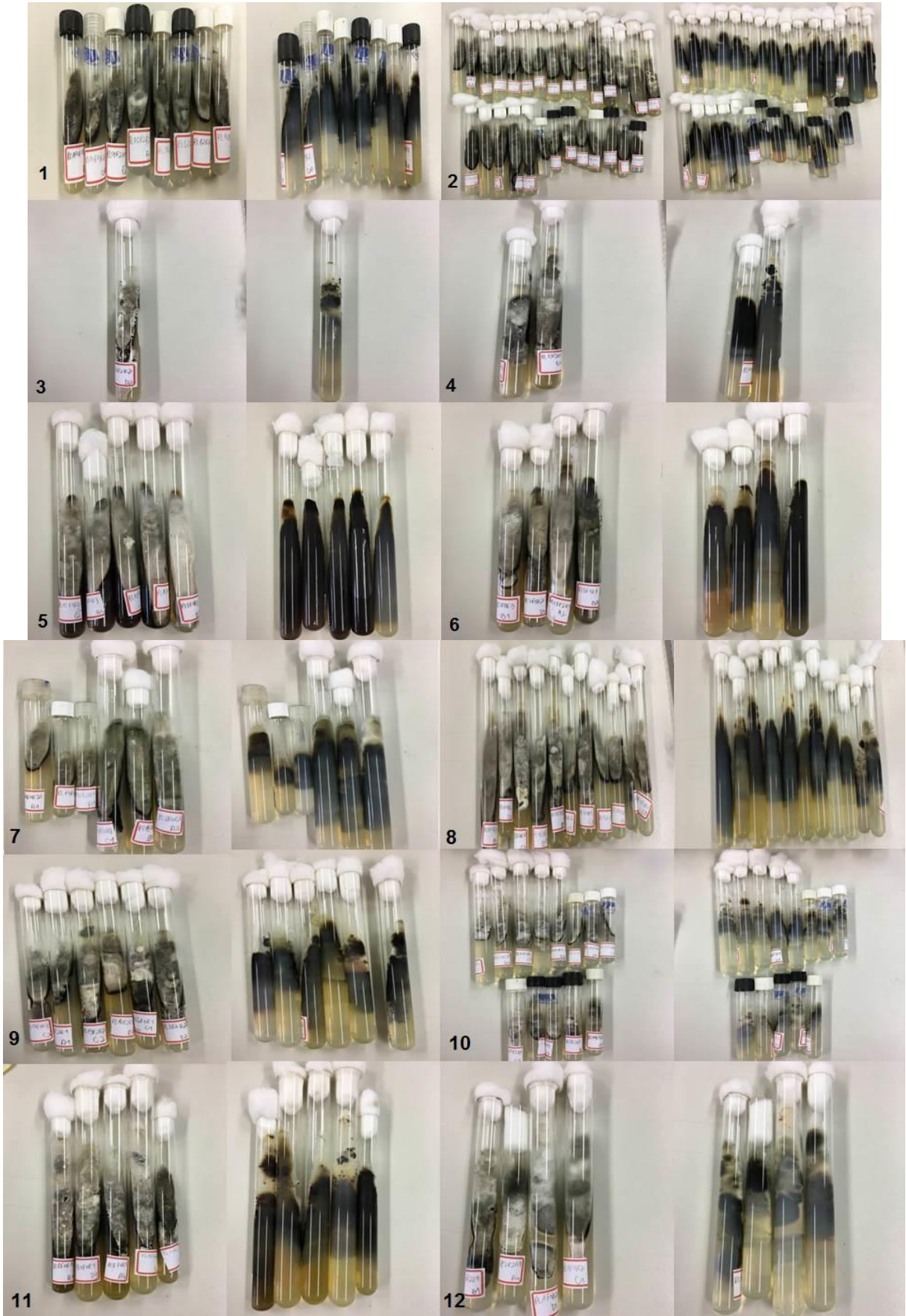
23	17	<p>VERSO: bordo irregular, cor cinza e de aspecto úmido. REVERSO: varia entre tons de castanhos claros a escuros e bordos irregulares.</p>
24	3	<p>VERSO: coloração cinza esbranquiçada. REVERSO: escuro e tornou o meio muito amarelo.</p>
25	3	<p>VERSO: bordo regular e coloração cinza claro. REVERSO: tons de cinzas claros.</p>
26	6	<p>VERSO: bordos irregulares na cor preta, aspecto algodono- cinza. REVERSO: claro sobreposto de manchas pretas.</p>
27	2	<p>VERSO: enrugado com protuberâncias laranjas. REVERSO: claro enrugado.</p>
28	9	<p>VERSO: meio rosado de maneira leve com muitas protuberâncias pretas. REVERSO: transparente com protuberâncias pretas.</p>
29	5	<p>VERSO: bordos regulares na cor roxa, algodono- roso. REVERSO: roxo.</p>
30	5	<p>VERSO: algodono- rosa. REVERSO: rosa claro.</p>
31	3	<p>VERSO: algodono- levemente roxo com poucas protuberâncias. REVERSO: incolor com protuberâncias.</p>
32	4	<p>VERSO: algodono- lilás. REVERSO: lilás.</p>
33	2	<p>VERSO: crescimento irregular da colônia, textura algodono- rosa claro. REVERSO: incolor.</p>
34	3	<p>VERSO: textura cerebriforme levemente rosado/lilás. REVERSO: rugoso.</p>
35	3	<p>VERSO: textura cerebriforme rosado. REVERSO: rugoso.</p>
36	6	<p>VERSO: textura cerebriforme variando entre branco rosado e branco lilás. REVERSO: rugoso.</p>
37	1	<p>VERSO: textura cerebriforme rosa escuro. REVERSO: rugoso</p>
38	7	<p>VERSO: aspecto pulverulento na cor lilás. REVERSO: branco</p>
39	7	<p>VERSO: aspecto pulverulento na cor roxa. REVERSO: branco</p>
40	3	<p>VERSO: bordos regulares, textura algodono- rosa em tons de amarelo com pigmentações rosas. REVERSO: tons de castanho.</p>
41	3	<p>VERSO: bordos irregulares, colorações em amarelos. REVERSO: castanho escuro com regiões em castanho claro que lembra folhas.</p>
42	4	<p>VERSO: bordos regulares, textura algodono- de cor areia. REVERSO: castanho claro.</p>
43	3	<p>VERSO: branco, verde e preto. REVERSO: castanho claro.</p>
44	1	<p>VERSO: cor preto e branco. REVERSO: preto.</p>
45	1	<p>VERSO: bordos irregulares, algodono- com pigmentação amarelada. REVERSO: castanho escuro e mudou coloração do meio para um amarelo fluorescente.</p>
46	2	<p>VERSO: algodono- roso. REVERSO: claro.</p>
47	6	<p>VERSO: algodono- roso com regiões cinzas. REVERSO: tons de castanhos.</p>

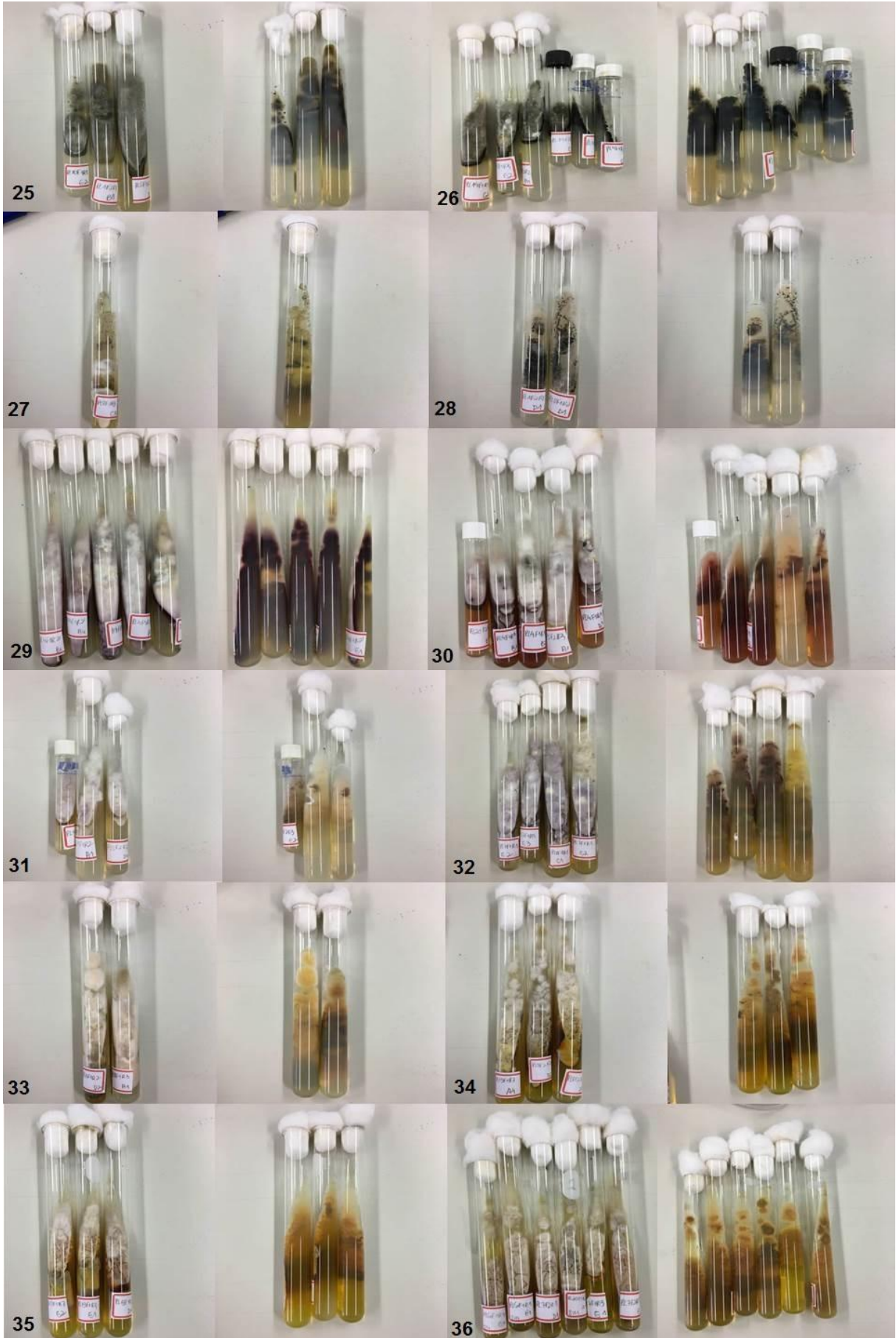
48	1	<p>VERSO: bordos irregulares, algodinoso e com coloração amarelo flúor.</p> <p>REVERSO: escuro e é possível notar alteração na cor do meio (amarelo fluorescente)</p>
49	1	<p>VERSO: algodinoso marrom claro e de aspecto úmido.</p> <p>REVERSO: castanho claro.</p>
50	21	<p>VERSO: bordos irregulares, coloração levemente cinza e de aspecto úmido.</p> <p>REVERSO: tons de castanho.</p>
51	21	<p>VERSO: bordos regulares, algodinoso em tons de cinza e marrom claro.</p> <p>REVERSO: varia entre tons de castanho.</p>
52	30	<p>VERSO: algodinoso com pigmentações de diversas cores.</p> <p>REVERSO: tons de castanho</p>
53	3	<p>VERSO: bordas irregulares e coloração branca.</p> <p>REVERSO: rugoso e castanho claro.</p>
54	1	<p>VERSO: bordas regulares, coloração branca e de aspecto seco.</p> <p>REVERSO: cor do meio.</p>
55	2	<p>VERSO: branco com poucas protuberâncias escuras.</p> <p>REVERSO: amarelado.</p>
56	2	<p>VERSO: bordas regulares, coloração branca com várias protuberâncias escuras e com aspecto seco.</p> <p>REVERSO: cor clara e protuberâncias escuras.</p>
57	4	<p>VERSO: meio dominado por protuberâncias pretas e pouquíssima coloração branca.</p> <p>REVERSO: com protuberâncias pretas.</p>
58	4	<p>VERSO: predominante a cor preta, porém há regiões significativas de cor branca.</p> <p>REVERSO: tons claros e escuros.</p>
59	5	<p>VERSO: branco com protuberâncias pretas.</p> <p>REVERSO: amarelado e com protuberâncias pretas</p>
60	2	<p>VERSO: predominante branco de aspecto úmido.</p> <p>REVERSO: amarelado e com protuberâncias pretas.</p>
61	11	<p>VERSO: levemente rosado de textura algodinoso com protuberâncias pretas.</p> <p>REVERSO: levemente rosado com protuberâncias pretas.</p>
62	15	<p>VERSO: coloração cinza e protuberâncias pretas.</p> <p>REVERSO: cinza claro com protuberâncias pretas.</p>
63	11	<p>VERSO: bordas regulares, textura algodinoso de coloração branca levemente rosada e/ou amarela com protuberâncias pretas espalhadas.</p> <p>REVERSO: protuberâncias pretas.</p>
64	27	<p>VERSO: mesclado de textura branca com protuberâncias pretas, lembrando um "dálmeta".</p> <p>REVERSO: transparente com manchas escuras.</p>
65	4	<p>VERSO: bordas irregulares, textura algodinoso em tons brancos levemente rosados.</p> <p>REVERSO: levemente enrugados.</p>
66	10	<p>VERSO: muitas protuberâncias pretas encrustadas em textura levemente algodinoso na coloração branca ou levemente laranja.</p> <p>REVERSO: levemente alaranjado e protuberâncias pretas.</p>
67	2	<p>VERSO: algodinoso em tom cinzento de aspecto opaco.</p> <p>REVERSO: castanho.</p>
68	21	<p>VERSO: algodinoso branco com protuberâncias pretas e algumas pigmentações coloridas.</p> <p>REVERSO: protuberâncias pretas e a coloração do meio varia em tons de castanho.</p>
69	1	<p>VERSO: algodinoso levemente lilás.</p> <p>REVERSO: manchas roxas.</p>

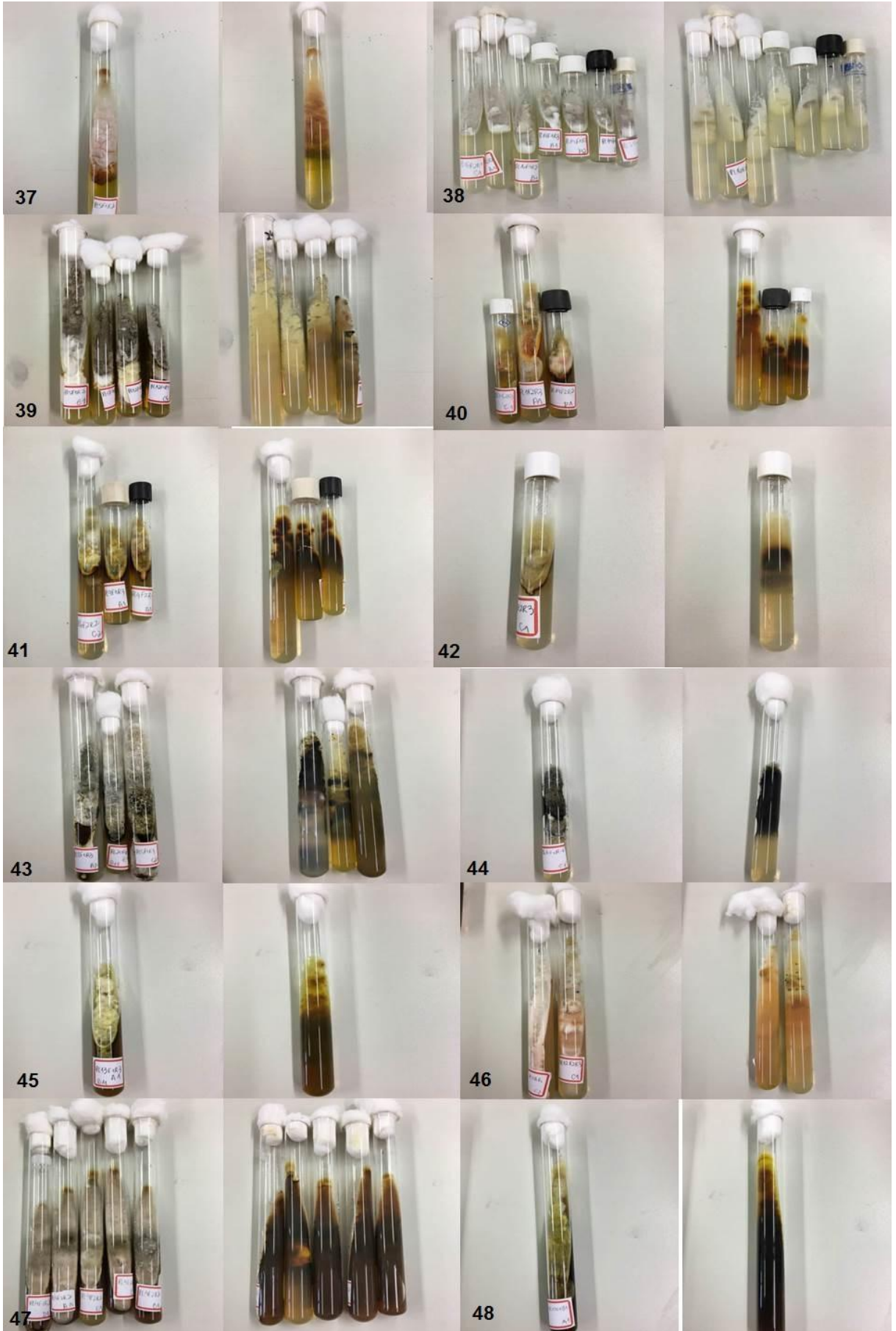
70	1	VERSO: coloração branca com aspecto seco e bordas irregulares que lembram ramificações. REVERSO: castanho.
71	1	VERSO: bordos irregulares, algodonoso branco. REVERSO: liso.
72	1	VERSO: bordos irregulares, aspecto seco com cores pretas, cinza e preto. REVERSO: com protuberâncias pequenas pretas espalhadas.
73	1	VERSO: bordos irregulares, textura algodonosa de coloração meio amarelada. REVERSO: castanho claro.
74	4	VERSO: bordos irregulares com colorações em castanho escuro e claro, algodonoso em castanho claro. REVERSO: liso e em tons de castanho.
75	11	VERSO: algodonoso branco. REVERSO: liso.
76	16	VERSO: bordos irregulares, algodonoso em tons de castanho amarelado. REVERSO: tons de castanho com protuberâncias irregulares.
77	24	VERSO: algodonoso branco. REVERSO: cores clara com protuberâncias de diversos tamanhos e cores em tons pretos, castanhos e cinza.
78	30	VERSO: algodonoso branco com bordos levemente escuros. REVERSO: manchado em tons escuros .
79	40	VERSO: branco com muitas protuberâncias pretas. REVERSO: protuberâncias pretas.
80	3	VERSO: totalmente branco REVERSO: liso amarelado.
TOTAL:		624

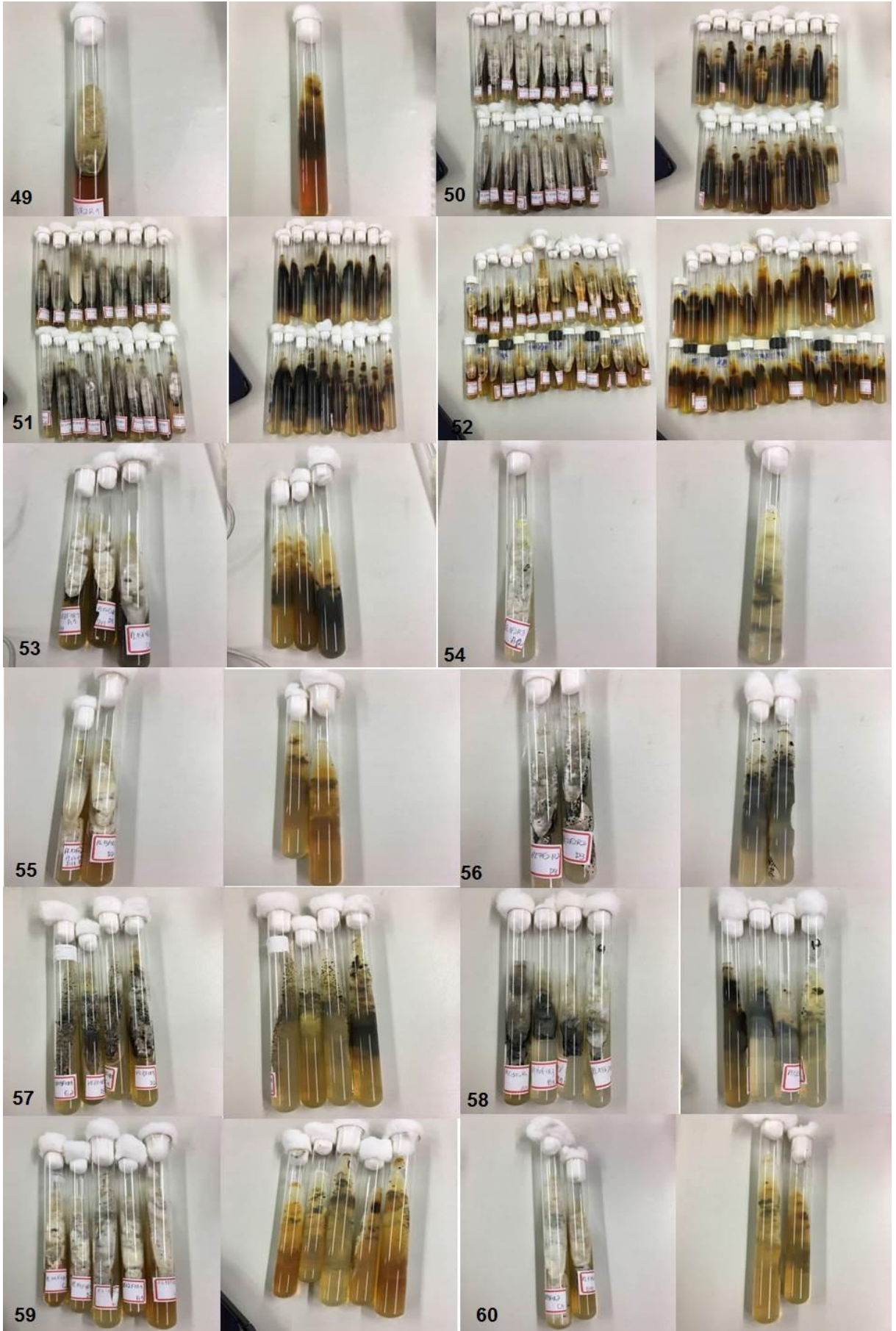
FONTE: o autor (2018).

FIGURA 11- MACROMORFOLOGIA DO VERSO E REVERSO DOS ISOLADOS FÚNGICOS CULTIVADOS EM MEIO BDA A 28±1°C POR 14 DIAS. A SEQUÊNCIA DAS NUMERAÇÕES NAS IMAGENS CORRESPONDE A CLASSIFICAÇÃO NO QUADRO 2.











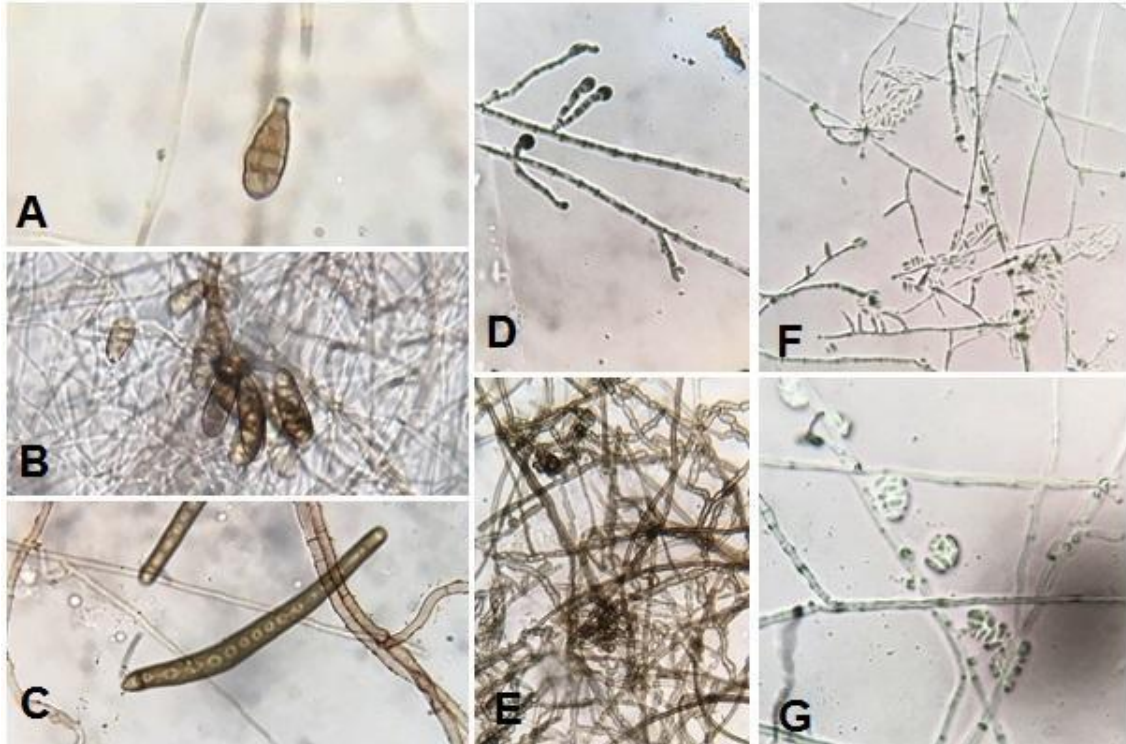


FONTE: o autor (2018).

4.2.2. MICROMORFOLOGIA

Através da visualização das estruturas reprodutivas aliadas à morfologia colonial e literatura foi possível identificar os gêneros: *Isaria* sp., *Beauveria bassiana*., *Drechslera* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Rhizopus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., e *Acremonium* sp. (FIGURA 12).

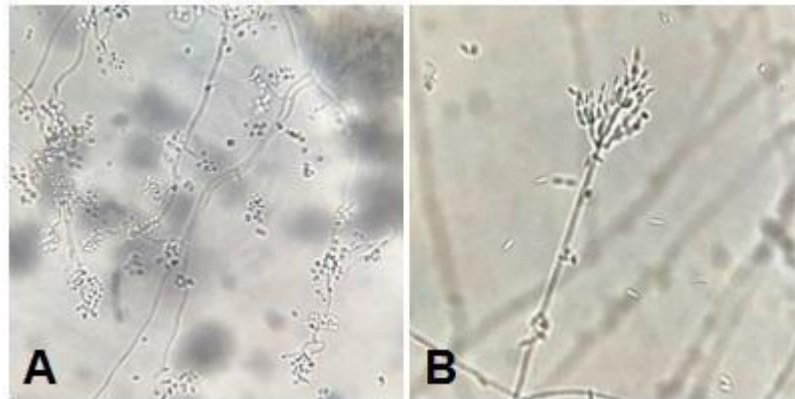
FIGURA 12 - FUNGOS ISOLADOS DE FOLHAS DE PLANTAS DE MILHO, CRESCIDOS POR 14 DIAS EM MEIO BDA, A $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (AUMENTO 400 X). A) *ALTERNARIA* SP. B) *BIPOLARIS* SP. C) *DRESCHLERAS* SP. D) *RHIZOPUS* SP. E) *COLLETOTRICHUM* SP. F) *FUSARIUM* SP. G) *ACREMONIUM* SP.



FONTE: autor (2018).

Em comparação com dados obtidos em trabalhos anteriores realizados no LabMicro-DPAT-UFPR (não publicados) em que não foram encontrados entomopatógenos, neste isolamento foram obtidos dois fungos entomopatogênicos: *Isaria* sp. e *Beauveria bassiana* (FIGURA 13). Os fungos do filo Ascomycota são caracterizados por hifas septadas que se diferenciam em células conidiogênicas, conidióforos ou fiálides e os conídios que são as estruturas de reprodução assexuada (ROJAS, 2015). Dentro desse filo, a ordem Hypocreales é dividida em três famílias de fungos entomopatogênicos: Cordycipitaceae (gêneros de maior importância agrícola: *Beauveria*, *Isaria* e *Lecanicillium*), Clavicipitaceae (*Metarhizium*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Pochonia*) e Ophicordycipitaceae (*Hirsutella* e *Syngliocladium*) (HUMBER, 2012).

FIGURA 13 - FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE PLANTAS DE MILHO, CRESCIDOS POR 14 DIAS EM MEIO BDA, A $28 \pm 0,5$ °C (AUMENTO 400 X). A) *BEAUVERIA BASSIANA*. B) *ISARIA* SP.



FONTE: autor (2018).

Em 1923, houve os primeiros estudos envolvendo fungos entomopatogênicos e duas espécies de cigarras foram infectadas pelo fungo *M.anisopliae* sendo o primeiro trabalho de pulverização no país a utilizar um microrganismo para combater outro microrganismo. Nas décadas seguintes ocorreram mais trabalhos/projetos de controle microbiano no Brasil. Em 2008, Alves et al. relatou a presença de *B.bassiana* no controle de gafanhotos.

O gênero *Isaria*, se encontra em quase todo o mundo infectando naturalmente diversas espécies de insetos da ordem *Diptera*, *Hemiptera* e *Hymenoptera*. Os conídios são geralmente de cor hialina, unicelular e produzidos em cadeias basípeta. (D'ALESSANDRO, 2015). Pode ser frequentemente isolado do solo, no ar, nas plantas e seus conídios geralmente são de cor hialina e unicelular (CANTONE;VANDENBERG,1998; ZIMMERMANN, 2008).

I. fumosororea é uma espécie complexa, ou seja, possui uma grande variabilidade entre os isolados da mesma espécie e o mesmo já foi isolado a partir de mais de 40 espécies de artrópodes. Cresce rapidamente e coloniza com micélio branco o qual pode mudar para a cor rosa ou púrpura. Os fatores abióticos e bióticos interferem em seu crescimento, estabilidade e patogenicidade. Os fatores abióticos de maior importância incluem: temperatura, umidade, radiação UV e a planta hospedeira do inseto alvo (ZIMMERMANN,2008).

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin 1912 pertence à classe Hyphomycetes, família Moniliaceae, e é comumente encontrado no solo e possui alta taxa de crescimento, resistindo às barreiras físico-químicas do tegumento, que é

sua via de inoculação, e da hemolinfa do hospedeiro (ATHAYDE et al., 2001; FANCELLI; MESQUITA, 2000; FERREIRA, 2004). É uma das espécies, se não a mais estudada e utilizada no controle de artrópodes, provavelmente em função da ampla distribuição geográfica e da variedade de seus hospedeiros (ALVES, 1998).

A maioria dos trabalhos nos quais esse fungo foi utilizado objetivava o controle de pragas agrícolas, mas alguns autores já demonstraram bons resultados no uso de *B. bassiana* em controle de parasitos de animais (MONTEIRO et al, 2003).

Isolados de *B. bassiana* podem diferir significativamente quanto à virulência a larvas e adultos de cascudinho em condições de laboratório (GEDEN et al. 1998, CRAWFORD et al. 1998, CHERNAKI-LEFFER 2004). Essa diferença de virulência provavelmente está relacionada à variabilidade genética dos isolados (CASTRILLO; BROOKS 1998, CASTRILLO et al. 1999).

Os demais isolados, encontrados como endófitos neste trabalho, podem ser potenciais patógenos vegetais. A mancha bronzeada é causada pelo fungo fitopatogênico *Drechslera sp.* e a doença inicialmente se manifesta nas folhas da planta com manchas tipicamente ovais ou arredondadas de coloração marrom (LINHARES et al). É um patógeno de ocorrência mundial e ataca diversas culturas de grande importância, como o trigo, arroz e centeio (HOSFORD Jr., 1982; KRUPINSKY, 1982; 1992).

No Brasil, essa doença acomete principalmente os estados do Paraná, Santa Catarina e o Rio Grande do Sul. As medidas de controle para se evitar a doença incluem: rotação de cultura, pousio, incorporação de restos culturais, utilização de cultivares resistentes e tratamento com fungicidas. Já esta última medida de controle não é muito viável visto o custo, a possibilidade de aquisição de resistência pelo patógeno e as consequências negativas para o ecossistema (LINHARES, 1995).

O fungo *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. é o agente causal da podridão mole, o qual é considerado um dos principais causadores de doenças da pós colheita. Os prejuízos numa pós-colheita geralmente apresentam danos superiores a 50% (OGAWA et al., 1995).

É um fungo de armazenamento, sendo encontrado em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao

produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto (MILLER, 1995; SINHA *et al* 1991).

Entre os métodos alternativos visando o controle de doenças pós-colheita, especialmente de *Rhizopus*, a irradiação ultravioleta (UV-C, 254 nm) tem-se destacado por não deixar resíduos e exercer efeito fungicida e/ou induzir resposta de resistência em frutos (WILSON *et al.*, 1994). A irradiação ultravioleta (UV), na faixa de 200- 280 nm é classificada como UV-C (LU *et al.*, 1991) e a aplicação de luz UV-C (254 nm) em baixas doses mostrou-se eficiente na indução de resistência em vários produtos vegetais (SHAMA & ALDERSON, 2005). Lu *et al.* (1993) verificaram que pêssegos expostos à irradiação UV-C apresentaram menor incidência de podridões. Segundo esses autores, o atraso no amadurecimento e na resistência à deterioração foi, provavelmente, induzido como resultado do estresse imposto sobre o hospedeiro pela baixa dose de UV-C.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos de maior importância, uma vez que são os responsáveis por serem os agentes causais da antracnose. Num ranking de fungos fitopatógenos, esse gênero ocupa a oitava posição em importância econômica e fitopatológica do mundo (LOPES, 2015). As plantas acometidas por essa doença estão sujeitas em todas as fases do desenvolvimento. A disseminação do patógeno ocorre por fatores ambientais e as sementes se infectadas também o transmitem. (MENEZES, 2006).

A caracterização morfológica ocorre devido à presença de células conidiogênicas as quais são agregadas em conidiomata (acérvulos). As setas e células conidiogênicas parecem ser homólogas. Os conídios são produzidos nos acérvulos e estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos a qual é responsável por proteger os conídios da dissecação quando não houver a presença de água (MENEZES, 2006).

O gênero *Bipolaris sp.* é caracterizado pela presença de conídios presos à célula conidiogênica e também por apresentar um conídio fusiforme. Encontrado em milho, é responsável por uma doença que acomete a planta em todo território brasileiro. A sobrevivência do patógeno ocorre em grãos remanescentes na área ou em restos culturais previamente infectados. A explicação para isso é que os conídios são transportados pelo vento e chuvas. Se houverem condições climáticas favoráveis (22° a 30°C) e elevada umidade relativa existe surgimento da doença (LOURENÇÃO e GRIGOLLI).

O gênero *Fusarium* é considerado como o principal fitopatógeno de várias gramíneas, sendo que no milho se destaca pela alta frequência e alta porcentagem de ocorrência, tanto no Brasil como em outros países e caracteriza-se, também, pela produção de fumonisinas em milho, alimentos derivados do milho, milho pipoca e rações à base de milho (BOOTH 1971, WINDHAN & KING 1983, CASA *et al.* 1998). Geralmente infecta os campos de produção de sementes. (PINTO, 1997) e a sua identificação ocorre devido à presença de macroconídios, microconídios e clamidósporos. É um gênero que possui grande diversidade morfológica, fisiológica e ecológica. Acontece com maior frequência em lugares de clima tropical e subtropical e sua longevidade em solos é explicada pela formação de estruturas chamadas clamidósporos. São organismos capazes de habitar ramos, folhas, inflorescências e frutos através dos seus conídios que são espalhados pelo ar/água. Devido à facilidade de dispersão atacam sementes e a prevalência do tempo úmido na maturação dos grãos, colheita ou armazenamento causam a podridão no grão (LAZAROTTO, 2013).

Acremonium sp. é patogênico ao milho e a outros grãos. É responsável pelo apodrecimento de diversas partes da planta. No cenário econômico, afeta a produtividade e o lucro por interferir diretamente no vigor da cultura. No Egito é considerado um patógeno primário do milho e no Brasil como secundário. Todavia nos EUA é considerado um patógeno de baixa agressão uma vez que a contaminação por este ocorre por insetos e outras fontes (TEIXEIRA e MACHADO, 2003).

No Brasil, a cultura do milho está sendo prejudicada com a presença desse patógeno e acredita-se que a principal causa dessa enfermidade seja o fato do fungo estar adaptado às regiões produtoras desse cereal (TEIXEIRA; MACHADO, 2003).

Alternaria sp. é considerado um fungo de campo por requerer um alto teor de umidade para se desenvolver. Quando o milho é armazenado e há essas condições normalmente o fungo invade os grãos/sementes provocando altos danos (VALMORBIDA, 2016). Esses danos são vistos por meio de manchas foliares necróticas, circulares, elípticas ou angulares, pardo-escuras, isoladas ou em grupos, com a presença de anéis concêntricos e bordos bem definidos (TÖFOLI *et al.* 2013).

Esse gênero possui três espécies patogênicas: *A. solani*, *A. alternata* e *A. grandis*. Ainda segundo os estudos, a variação dessas espécies varia conforme a

localidade. Na Europa é comum a presença de *A. solani*, *A. alternata* enquanto que nos EUA a ocorrência é de *A. solani*. No quesito de sintomatologia as três espécies não diferem, todavia na micromorfologia é possível distingui-las pela morfologia dos conídios. No gênero, as características morfológicas mais importantes para a caracterização e a identificação das espécies incluem as dimensões dos conídios e dos bicos dos conídios que cada um apresenta. Os conídios são altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até um ano nestas condições. Os conídios de *Alternaria* são dispersos através do vento, insetos e água. (VASCONCELOS et al, 2014).

4.3. TESTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA SOBRE LAGARTAS DE *Duponchelia fovealis*.

Após observação da mortalidade das larvas de *D. fovealis* pelo período de 7 dias, constatou-se que, embora tenha ocorrido morte de insetos, os números não diferiram estatisticamente ($p < 0,01$) do que foi observado no grupo controle, inoculado apenas com solução salina 0,85% e tween 80. Assim, os isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. testados nesse trabalho não foram patogênicos a lagartas de 3 instar de *D. fovealis*. Conforme pode ser observado no GRÁFICO 1, o teste de Tukey demonstrou não haver diferença entre as médias, em que letras iguais significam resultados equivalentes. É importante que novos estudos sejam feitos e que concentrações maiores sejam testadas a fim de comprovar que realmente não sejam efetivos nesse trabalho.

A mortalidade de lagartas durante o bioensaio pode ser evidenciada no GRÁFICO 2. Embora estatisticamente não significativos, os resultados mostram uma tendência de aumento de mortalidade com os tratamentos B (*B. bassiana*) e o E (*Isaria* PL7F1R2-C2). Além disso, é possível observar a extrusão dos fungos em alguns insetos mortos (FIGURA 14), o que evidencia que ocorreu infecção. E, ainda, o fato de algumas lagartas não apresentarem esporos dos fungos não descarta totalmente a possibilidade de elas terem sido mortas pelos isolados testados. Eventuais fissuras no tegumento, provocadas pela manipulação durante a transferência desses cadáveres para a câmara úmida, por exemplo, contribuem para uma ação rápida de bactérias decompositoras sobre os cadáveres, impedindo a esporulação do fungo (TAMAI et al 2002).

MOINO JUNIOR (1993), ao avaliar a patogenicidade de 72 isolados de *B. bassiana* para pragas de grãos armazenados, constatou uma grande variação nas mortalidades entre esses isolados. Dados semelhantes foram apresentados por RAMOS (2001), ROSSI (2002) e TAMAI (2002). Apesar de serem patógenos da mesma espécie, o comportamento diferente em relação à patogenicidade entre os isolados de *Isaria*, bem como entre *B. bassiana*, pode estar relacionado à virulência e, conseqüentemente, à produção de metabólitos secundários que influenciam na capacidade do patógeno em causar a doença. Além das qualidades intrínsecas do patógeno, a suscetibilidade e/ou resistência natural do próprio inseto hospedeiro é outro fator a ser considerado na patogenicidade de um isolado (ALVES, 1998).

Em bioensaios de seleção, essas variações das patogenicidades já têm sido observadas e podem estar relacionadas a fatores como virulência, especificidade e tolerância do hospedeiro, conseqüência da variabilidade genética de cada uma desses isolados (VESTERGAARD et al., 1995; ALVES, 1998).

SANTORO et al., (2000), realizaram um trabalho sobre a interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. Os autores verificaram que diferenças na mortalidade podem ser conseqüências do número de conídios que efetivamente entraram em contato com o inseto, que no tratamento de superfície é, provavelmente, inferior, por ficarem os conídios restritos a algumas regiões do corpo, como pernas e parte ventral, já em pulverização e imersão, um maior número de conídios entram em contato com o corpo inteiro do inseto, com possibilidade de germinação e penetração, o que aumenta a mortalidade.

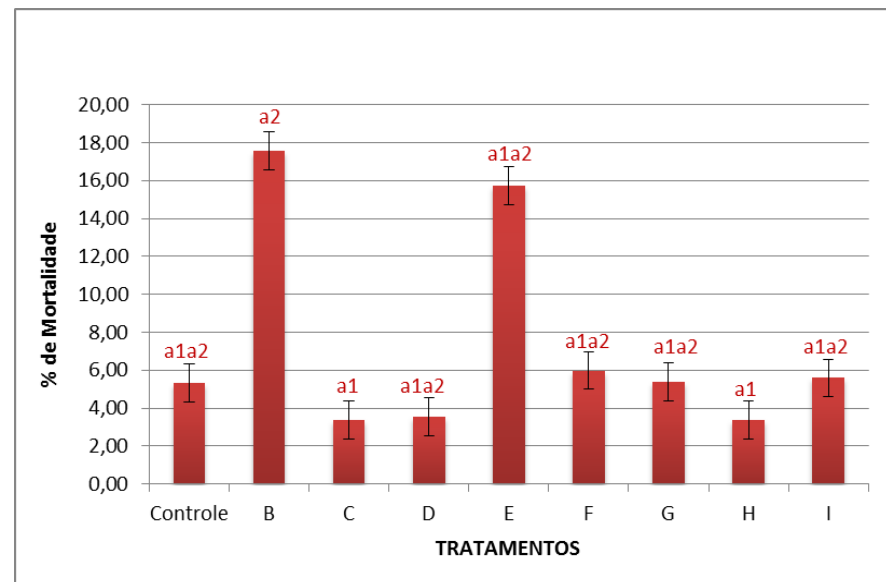
B. bassiana já mostrou ser eficiente em diversas pragas do algodão, possuindo formulações como por exemplo a Naturalis-L que já foi testada nos EUA, México, Nicarágua, Egito, Turquia e Austrália (WRIGHT & KNAUF, 1994). No Brasil, esse fungo também possui formulações, sendo a mais comum chamada de Boveril para o controle de *Tetranychus urticae* (TANZINI, 2002).

No Brasil, ainda não existe nenhum produto registrado a base de *Isaria* e ainda há poucos estudos feitos com espécies deste gênero de fungo. Porém, há uma demanda crescente para o desenvolvimento de biopesticidas à base de *I.fumosorosea* (ROJAS, 2015). Não existem muitos relatos científicos da utilização de *Isaria sp.* sobre *Thaumastocoris peregrinus*. Sobre outros hemípteros sua atuação está confirmada, porém não com tanto destaque como *Beauveria bassiana*

(LORENCETTI, 2013)

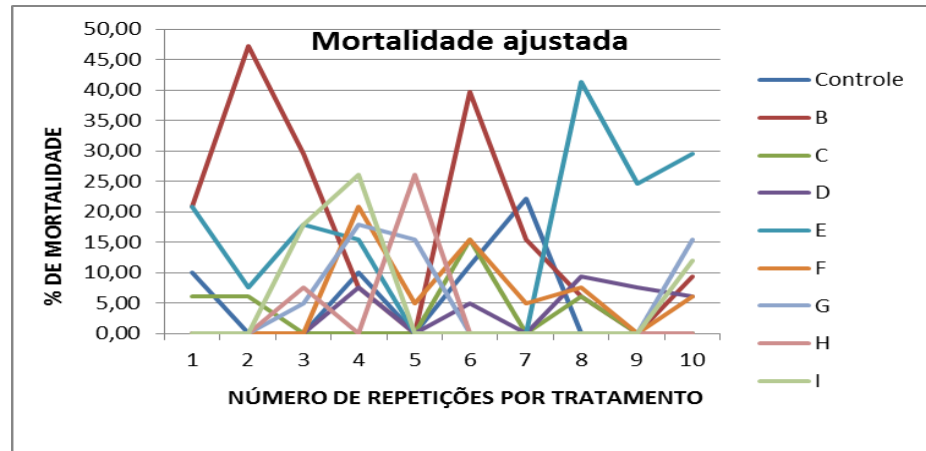
Estudo recentes com a praga *D. fovealis* e isolados de *B.bassiana* (Bea 111) e *Isaria javanica* (Isa 340) indicam que estes são fortes candidatos no controle da praga do morangueiro e que apresentam potencial para o desenvolvimento de produtos como micoinseticidas (AMATUZZI et al., 2018). É importante frisar ainda, que esse estudo produzido por AmatuZZi e colaboradores representa o primeiro trabalho de fungos entomopatogênicos isolados do solo infectando *D. fovealis*.

GRÁFICO 1 - MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º ÍNSTAR DE *D. fovealis*. AVALIADAS DIARIAMENTE POR 7 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES DE ESPOROS (10^8 ESPOROS/ML). BARRAS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ($P < 0,01$)



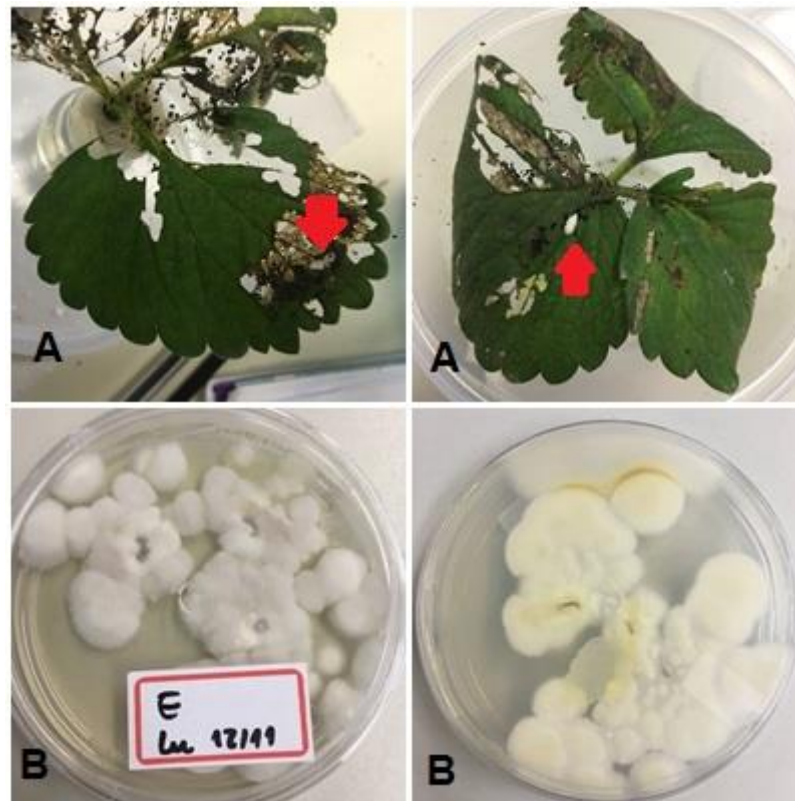
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 2- MORTALIDADE CONFIRMADA E AJUSTADA, 7 DIAS APÓS A PULVERIZAÇÃO POR DIFERENTES SUSPENSÕES FÚNGICAS.



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 14 - A. LAGARTAS DE 3º INSTAR APRESENTANDO EXTRUSÃO DO FUNGO NA FOLHA DE MORANGUEIRO. B. ISOLADO FÚNGICO PL7F1R2-C2 PERTENCENTE AO GÊNERO *ISARIA* EXTERIORIZADO EM MEIO BDA A $28 \pm 0,5$ °C POR 3 DIAS.



FONTE: O autor (2018).

Os resultados observados neste trabalho indicam que, embora estatisticamente equivalentes ao controle, os fungos *B. bassiana* e *Isaria* causaram a mortalidade de lagartas de *D. fovealis*. Isto é um indicativo de que novos bioensaios precisam ser realizados, na tentativa de determinar se estes isolados fúngicos poderão ser utilizados no controle biológico desta praga. Ainda, estes isolados podem ser potenciais controladores biológicos de outros insetos, pragas de outras culturas importantes, o que poderá ser evidenciado em trabalhos futuros.

4.4. COMPILAÇÃO DOS DADOS DE ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MILHO NO PERÍODO DE 2007 A 2018.

Durante os últimos 11 anos (2007-2018) foram realizados seis isolamentos de endófitos de milho pelo grupo do LabMicro – DPAT – UFPR. Efetivamente, os locais de coleta foram realizados em quatro cidades diferentes localizadas no Paraná: Palotina, Cascavel, Curitiba e Prudentópolis. Após as coletas, todas as folhas seguiram o protocolo de isolamento descrito previamente neste trabalho.

O primeiro isolamento foi feito a partir de plantas coletadas em Palotina (2007), no qual foram obtidos 194 isolados, com uma frequência de infecção de 31%. Em 2011, foram isolados 54 fungos de plantas coletadas em Curitiba, totalizando uma frequência de infecção de 10,8%. Plantas coletadas em Cascavel (2013) resultaram em 328 isolados fúngicos e frequência de infecção de 65,6%. Dois novos isolamentos feitos em Curitiba (2015 e 2016) levaram à obtenção de 89 e 334 isolados, respectivamente, com frequências de infecção de 37,08% e 100%. O último isolamento, detalhado neste trabalho, foi feito com plantas coletadas em Prudentópolis (2018), totalizando 624 isolados e 100% de frequência de infecção. Assim, em 11 anos de projeto, foram obtidos 1623 isolados e a frequência média de infecção foi de 57,4%. Os isolados foram mantidos na coleção do LabMicro-DPAT-UFPR. Um resumo destes dados pode ser visto no quadro 3 e GRÁFICOS 3 e 4.

QUADRO 3 - ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MILHO EM CIDADES DO PARANÁ NO PERÍODO DE 2007 A 2018.

Local	Ano	Número de isolados	Frequência de infecção %
Palotina	2007	194	31,0
Curitiba	2011	54	10,8
Cascavel	2013	328	65,6
Curitiba	2015	89	37,0
Curitiba	2016	334	100,0
Prudentópolis	2018	624	100,0

FONTE: O autor (2018).

As diferenças nas frequências de infecção observadas podem ser explicadas devido às diferenças nas condições de cultivo da planta, influência da sazonalidade,

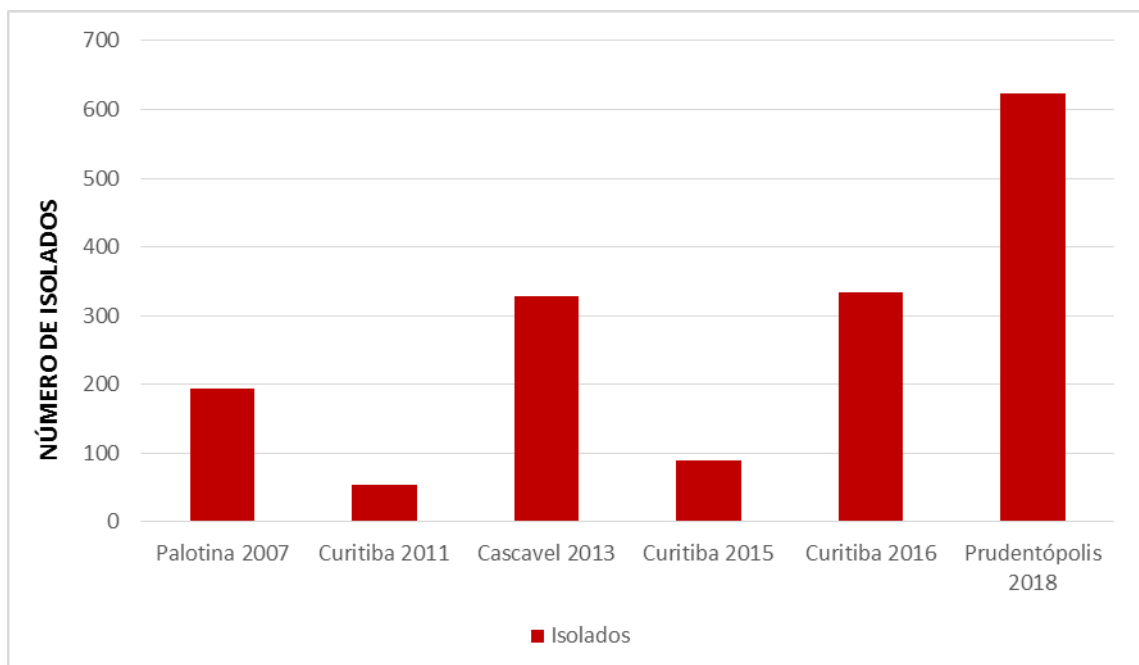
do tipo da planta e da localização da mesma, sugerindo que uma série de fatores está envolvida na colonização dos tecidos da mesma por fungos endofíticos.

Diferentes gêneros de fungos foram isolados e identificados, sendo os gêneros mais comuns: *Alternaria*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Blastomyces*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Mycelia sterilia*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Isaria* e *Beauveria bassiana*.

O objetivo inicial de todos os isolamentos realizados era isolar fungos entomopatogênicos encontrados como endofíticos em milho. Entretanto, isso só foi possível no último experimento (2018), relatado neste trabalho.

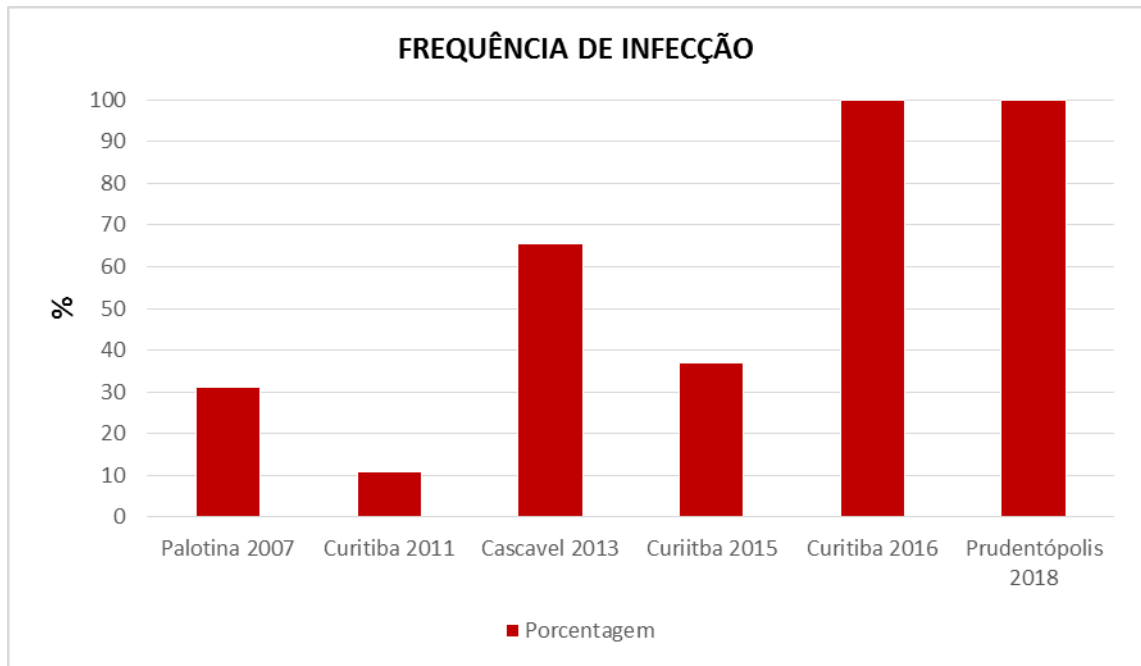
Conforme já discutido anteriormente, os fungos endofíticos e entomopatogênicos de milho, e de outras plantas, apresentam um grande potencial biotecnológico. Estes podem ser produtores de substâncias de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos e, principalmente, para este trabalho, ser utilizados no controle biológico de insetos pragas de importantes culturas no Brasil e no mundo.

GRÁFICO 3 – NÚMERO DE ISOLADOS OBSERVADOS NOS 6 ISOLAMENTOS.



FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 4 – FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO NOS 6 ISOLAMENTOS.



FONTE: O autor (2018).

5. CONCLUSÕES

1. Foram isolados 624 fungos endofíticos de plantas de milho coletadas em Prudentópolis, PR (2018).
2. A porcentagem de infecção foi 100%.
3. Os isolados foram classificados em 80 grupos morfológicos.
4. Foram identificados os gêneros *Drechslera sp.*, *Alternaria sp.*, *Bipolaris sp.*, *Rhizopus sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, e os entomopatógenos *Isaria sp.* e *Beauveria bassiana*.
5. Os isolados de *B. bassiana* e *Isaria sp* empregados contra *Duponchelia fovealis* não foram efetivos no seu controle.
6. Durante os últimos 11 anos (2007-2018) foram realizados 6 isolamentos de endofíticos de plantas de milho. Os gêneros isolados foram: *Alternaria*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Blastomyces*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Mycelia sterilia*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*.
7. O total de isolados no período de 2007 a 2018 foi 1623 e a frequência de infecção média de 57,4%, indicando que pode haver variação na diversidade e na frequência de infecção de acordo com o local e a época da coleta.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASIL. **Produção e exportação de milho devem crescer na safra 2018/2019**. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2018-08/producao-e-exportacao-de-milho-devem-crescer-na-safra-20182019> . Acesso em 16/11/2018.

ALI, S.; HUANG, Z.; REN, S. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 83, n. 4, p. 361-370, 2010.

ALVES, L. F. A. et al. First record of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on adults of cassava lace bug *Vatiga manihotae* (drake) (Hemiptera: Tingidae) in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológicos**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 309-311, 2012.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos**. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. p. 289-381.

AMATUZZI, R.F.; POITEVIN,C.G.; POLTRONIERI, A.S; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects** 2018, 9, 70; doi:10.3390/insects9020070.

ANTUNES LEC; DUARTE FILHO JD; CALEGARIO FF; COSTA H; REISSER JUNIOR C. 2007. PRODUÇÃO INTEGRADA DE MORANGO NO BRASIL. **INFORME AGROPECUÁRIO** 236: 34-39

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlandia, v. 21, n. 1, p 13 –15. 2001.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular Characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.729-732, 2000.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.

BARBOZA, M. R. et al. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). **Ambiência**, Guarapuava, v. 7, n. 3, p. 473-480, 2011.

BARROS, R. **Pragas do Milho**. Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012.

BEM PARANÁ. **Começa a safra de morango. O Paraná é o quinto produtor do fruto**. Disponível em: < <https://www.bemparana.com.br/noticia/comeca-a-safra-de-morango-em-todo-o-pais-> > Acesso em: 10/11/2018.

BERNARDINI, M.; CARILLI, A.; PACIONI, G.; SANTURBANO, B. Isolation of Beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*, **Phytochemistry**, New York, v. 14, n. 8, 1975, 1865 p.

BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 55, p. 7-16, 2010.

BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Surrey.

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

CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIN, L. 1998. Fungos associados à semente de milho produzido nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 23:370-373.

CASTRILLO, L.A. & W.M. BROOKS. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. **J. Invertebr. Pathol.** 72: 190-196.

CASTRILLO, L.A., B.M. WIEGMANN & W.M. BROOKS. 1999. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **J. Invertebr. Pathol.** 73: 269-275.

CHERNAKI-LEFFER, A.M. 2004. **Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 62p.

CHRISTENSEN, J.J. & WILCOXSON, R.D. **Stalk rot of corn. Saint Paul: The American Phytopathological Society.** 1966b.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, Berlin, v.73, p.358-362, 1987.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. grãos, v. 6 Safra 2018/19 - **Segundo levantamento**, Brasília, p. 1-142, novembro 2018.

CONCESCHI, M.R.; D'ALESSANDRO, C.P.; MORAL, R.; DEMETRIO, C.G.B.; DELALIBERA JR, I. Transmission potencial of the entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* from sporulated cadavers of *Diaphorina citri* and *Toxoptera citricida* to uninfected *D. citri* adults. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 61, p.567-577, 2016.

CRAWFORD, P.J., W.M. BROOKS & J.J. ARENDS. 1998. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Econ. Entomol.** 91: 1295-1301.

DAGLISH, G.J. 2004. Effect of exposure period on degree of dominance of phosphine resistance in adults of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Management Science** 60: 822-826.

D'ALESSANDRO, P.C. **Fungo *Isaria fumosorosea* é usado no controle biológico da mosca branca.** Disponível em: <
<http://www.revistacampoenegocios.com.br/fungo-isaria-fumosorosea-e-usado-no-controle-biologico-da-mosca-branca/>> Acesso em: 3/10/2018.

DAOUST, R. A.; PEREIRA, R. M. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in laboratory in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 15, p. 642 - 647, 1986.

DUARTE, J.O. et al. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção). Disponível em:
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/economia.htm Acesso em: 16/10/2018.

EFIL, L., O. ÖZGÜR & F. EFIL, 2014. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 2: 328-334

EMBRAPA. **Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção**, 1
 ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 7ª edição
 Set./2011.

EMBRAPA. **Controle biológico**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso em: 17/11/2018.

FADINI, M. A. M., PALLINI, A., VENZON, M. Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1271-1277, jul-ago, 2004.

FANCELLI, M.; MESQUITA, A. L. M. Pragas. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Ed.). **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 21-35. (Frutas do Brasil, 8).

FANCELLI, M.; DIAS, A.B.; JESUS, S.C.; I., DELALIBERA JÚNIOR; NASCIMENTO, A.S; SILVA, S. O. Controle biológico de *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae) pelo fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2004. 4 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado Técnico, 102).

FARIA, M.; WRAIGHT, S. P. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 767-778, 2001.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 22 - setembro/outubro 2001.

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

FERREIRA, J. M. S. Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos I - *Beauveria bassiana* (Vuill.). Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2004. 30 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de pesquisa e Desenvolvimento, 3.)

FILHO, I. A. P.; R, J. A. S. **Sorgo. O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa, Brasília DF 2015.

Fornazier, M. J., D. Pratissoli, D. Martins, L. P. S. Dasvi, C. P. Teixeira, A. T. Silva, E. L. Thompson, A. K. Rodrigues, R. S. Prates, E. Cozer, J. P. Moreira, L. Becalli, J. J. P. Paes, & M. O. Tiburcio, 2011. Praga exótica no estado do Espírito Santo - *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae). **Morango mais saudável - Morango monitorado e rastreado.**

FORSCHLER, B. T.; NORDIN, G. L. Comparative pathogenicity of selected entomogenous nematodes to the hardwood borers, *Prionoxystus robiniae* (Lepidoptera: Cossidae) and *Megacyllene robiniae* (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n. 2, p. 343 - 347, 1988.

Franceschini, M., Guimarães, A.P., Camassola, M., Frazzon, A.P., Baratto, C.M., Kogler, V., Silva, M.V., Dutra, V., Nakazoto, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 31: 32-37.

GASSEN, D.N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho.** Passo Fundo: Aldeia Norte, 134 p., 1996.

GEDEN, C.J., J.J. ARENDS, D.A. RUTTZ & D.C. STEINKRAUS. 1998. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in poultry litter, soil and a pupal trap. **Biol. Control**. 13: 71-77

GRIGOLLI, J. F. J.; LOURENÇÃO, A. L. F.; **Doenças do Milho Safrinha.** Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/downloads/doen%C3%A7as%20cultura%20do%20milho%20safrinha.pdf> Acesso em: 30/10/2018.

HAJEK, A. E.; LEGER, R. J. St.; Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 293-322, 1994.

HOSFORD Jr., R.M. Tan spot. In: HOSFORD Jr., R.M. (Ed.). **Tan spot of wheat and related diseases workshop**. Fargo, North Dakota State University. p.1-24. 1982.

HUMBER, R.A. Hurricane warning! How changed nomenclatural rules affect fungal entomopathogens. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 2012, Buenos Aires. **Proceedings...** 2012. Buenos Aires: SIP, 2012. p. 106-106.

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

KERN, M.E.; BLEVIS, K.S. **Microbiologia Médica**. Segunda edição. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KRUG, C.A.; CONAGIN, A.; JUNQUEIRA, A.A.B.; BRIEGER, F.B.; BLUMENSCHNEIN, A.; PATERNIANI, E.; MIRANDA, L.T.; SOHO, J.A.; PAES DE CAMARGO, A.; KEEPER, A.; VIEGAS, G.P.; GALLO, D.; PINHEIRO, E.D.; FERRAZ, E.C.; MALAVOLTA, E.; GARGANTINI, H.; PIMENTEL-GOMEZ, F.; CAMPOS, H.; NOVAES, R.F.; TEIXEIRA, C.G.; CAMARGO, R.; MENDES, T.T. (1966). **Cultura e adubação do milho**. Instituto Brasileiro de Postassa, São Paulo, 541 p.

KRUPINSKY, J.M. Grass hosts of *Pyrenophora triticirepentis*. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.1, p.92-95. 1992.

KRUPINSKY, J.M. Hosts of *Pyrenophora trichostoma*. In: HOSFORD Jr., R.M. (Ed.). **Tan spot of wheat and related diseases workshop**. Fargo, North Dakota State University. p.25-27. 1982

LAZZARINI, G. M. J. **Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans***. Goiânia, 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia)–Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Dissertação de Doutorado, 2013.

LEGER, R. J. St. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. 1119-1125, 1995.

LINHARES, A. MATSUMARA, A. T.S. LUZ, V.C. Avaliação da amplitude de ação antagonística de microrganismos epífitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA**, v.1, nº 3, 119-126, Set.-Dez., 1995

LOPES, L. H. R.; **Caracterização biológica, morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da cebola.** Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dissertação de Mestrado, 2015.

LOPES, R. B. et al. Virulência de *Isaria fumosorosea* a *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) e descrição dos sintomas da doença em cistos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., Uberlandia, 2008. **Anais...** [s. l.: s. n.], 2008.

LORENCETTI, G. A. T. et al. Ocorrência Espontânea de *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. 1912 (Ascomycetes: Clavicipitaceae) sobre *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, p 1403-1407, 2017.

LORENCETTI, G. A. T. **EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E PRODUTOS NATURAIS SOBRE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) E INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM PLANTAS.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

LOURENÇÃO, A.L. et al. Controle de *Sitophilus zeamais* em Milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e Pirimifos Metil. **Ecossistema**, Pinhal, v.18, p.69-74, 1993.

LU, J.Y., LUKOMBO, S.M., STEVENS, C., KHAN, V.A., WILSON, C.L., PUSEY, P.L. & CHAULTZ, E. Low-dose UV and gamma-radiation on storage rot and physicochemical changes in peaches. **Journal of Food Quality** 16:301-309. 1993.

LU, J.Y., STEVENS, C., KHAN, V.A. & KABWE, M. The effect of ultraviolet irradiation on shelf-life and ripening of peaches and apples. **Journal of Food Quality** 14:299-305. 1991.

MAGALHÃES, P.C; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. **Fisiologia do Milho**. Sete Lagoas, MG. Dez/2003.

MENEZES, M.; Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 3, p.170-179, 2006.

MILLER, J.D. -1995 - Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **J. Stored Prod. Res.**, 31 (1): 1-16.

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

MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, T.C; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: ixodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.559-563, mai-jun, 2003.

MÜLLER-KÖGLER, E.; ZIMMERMAN, G. On the viability of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In contaminated soil under field and laboratory conditions. **Entomophaga**, v. 31, p. 285 - 292, 1986.

MUSTU, M.; DEMIRCI, F.; KOÇAK, E. Mortality effects of *Isaria farinosa* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae). **Turkish Journal of Entomology**, Turkey, v. 35, p. 559-568, 2011.

OGAWA, J.M., ZEHR, E.I., BIRD, G.W., RITCHIE, D.F., URIU, K. & UYEMOTO, J.K. **Compendium of stone fruits diseases**. Saint Paul MN. APS Press. 1995.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.

PATT, J.M.; CHOW, A.; MEIKLE, W. G; GARCIA, C.; JACKSON, M.A.; FLORES, D.; SÉTAMOU, M.; DUNLAP, C.A.; AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; ADAMCZYK, J.J. Efficacy of an autodisseminator of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. **Biological Control**, Orlando, v.88, p.37-45, 2015.

PEETERS, H.; ZOCHER, R.; MADRY, N.; KLEINKAUF, H. Incorporation of Radioactive Precursors into Beauvericin Produced by *Paecilomyces fumosoroseus*. **Phytochemistry**, New York, v. 22, n. 8, 1719:1720, 1983.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de milho visando o controle de *Fusarium moniliforme* e *Pythium sp.* **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.32, n.8, p.797-801, ago. 1997.

PEIXOTO, C. de M. **O milho no Brasil, sua importância e evolução**, 2014. Disponível em: < <http://www.pioneersementes.com.br/media-center/artigos/165/o-milho-no-brasil-sua-importancia-e-evolucao>> Acesso em: 5/10/2018.

PIMENTEL, I. C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine Max* (L) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas.** Tese (doutorado). Curitiba, 2001, 154 p. Universidade Federal do Paraná.

POITEVIN, C.G.; ITO, F.A.D.; PIMENTEL, I.C. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 29º, 2018. Alagoas. Anais do 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Disponível em: <<https://www.sbmicrobiologia.org.br/29cbm-anais/resumos/15/R1386-2.PDF>> Acesso em: 29 de outubro de 2018.

POTRICH, M. et al. Virulência de fungos entomopatogênicos a ninfas de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Semina**, Londrina, v. 32, supl 1, p. 1783-1792, 2011.

THORVILSON, H. G.; LEWIS, L. C.; PEDIGO, L. P. Overwintering potential of *Nomuraea riley* (Fungi: Deuteromycotina) from *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) cadavers in central Iowa. **Journal Kansas Entomology Society**, v. 58, p. 662 - 667, 1985.

UENO B. 2004. MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS DO MORANGO. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2. **ANAIS...** PELOTAS: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. P. 69-77.

RAMOS, E.Q. **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B.** 2001. 57p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

RADIN B; LISBOA BB; WITTER S; BARNI V; REISSER JUNIOR C; MATZENAUER R; FERMINO MH. 2011. Desempenho de quatro cultivares de morangueiro em duas regiões ecoclimáticas do Rio Grande do Sul. **Horticultura Brasileira** 29: 287-291.

RESENDE LM DE A; MASCARENHAS MHT; PAIVA BM. 1999. PROGRAMA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MORANGO. **INFORME AGROPECUÁRIO** 20:5-19.

RIBEIRO, B.M., GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA, E.E., SANTOS, J.P. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research** 39: 21-31.

ROJAS, V.M.A. **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa.** Dissertação de Mestrado apresentada a USP, 2015.

RONDELLI, V.M., CARVALHO, J.R., PRATISSOLI, D., POLANCZYK, R.A., DE ALENCAR, J.R.D.C.C., ZINGER, F.D., PEREIRA, S.M.A. 2012. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolates for controlling *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae). **Idesia** 30: 97-102.

ROSSI, L.S. **Seleção de fungos entomopatogênicos e infecção de *Hirsutella* sp. em *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939).** 2002. 92p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SANHUEZA RMV; HOFFMANN A; ANTUNES LEC; FREIRE JM. 2005. **SISTEMA DE PRODUÇÃO DE MORANGO PARA MESA NA REGIÃO DA SERRA.**

SANTOS, R. S. S. et al. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em adultos hibernantes de *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 53-155, 2002.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos

entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.4, p.483-489, abr. 2007.

SINHA, K.K. & SINHA, A.K. -1991 - Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **J. Stored Prod. Res.**, 27 (1): 65- 68.

SILVA, E. P. **Caracterização de Bactérias Endofíticas e Isolamento do Fitopatógeno *Exserohilum turcicum* de Milho Crioulo (*Zea mays* var. Rosado).** UFSC, Santa Catarina, 2013.

SHAMA, G. & ALDERSON, P. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation. **Trends in Food Science and Technology** 16:128-136. 2005.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham.** Acta Amazonica, VOL. 34(2) 2004: 185 – 195.

SOUZA, J. C., R. A. SILVA, E. C. SILVEIRA, F. A. ABREU & M. A. Toledo, 2013. Ocorrência de nova praga nas lavouras de morango no Sul de Minas. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), **Circular Técnica** nº 180. 5 p.

TAMAI M A, ALVES S B, ALMEIDA J E M, FAION M (2002). **Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).** Arq Inst Biol 69: 77-84.

TANZINI, M.C. **Controle de percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos.** Tese de Doutorado apresentada a USP, São Paulo 2002.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J.C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.5, p.1045-1052, set./out., 2003.

TÖFOLI, J. G. et al. **Potato late blight and early blight: importancy, characteristics and sustainable management.** *Biológico*, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2013.

VALMORBIDA, R. **Fungos e Micotoxinas em grãos de milho (*Zea mays L.*) e seus derivados produzidos no Estado de Rondônia, Região Norte do Brasil.** Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Tese de Mestrado, 2016.

VASCONCELOS, C. V.; SILVA, D. C.; CARVALHO, D. D. C. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissl. em tubérculos de batata, no Brasil. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 219-222, abr./jun. 2014.

VESTERGAARD, S.; GILLESPIE, A.T.; BUTT, T.M.; SCHREITER, G.; EILENBERG, J. Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, p.185-192, 1995.

WATT, B. A.; LEBRUN, R. A. Soil effects of *Beauveria bassiana* on pupal populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, v. 13, p. 15 - 18, 1984

WILSON, C.L., EL GHAOUTH, A., CHALUTZ, E., CROBY, S., STEVENS, C., LU, J.Y., KHAN, V. & ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease** 78:837-844. 1994

WINDHAM, M.T. & KING, S.B. 1983. Mycoflora of roots of maize at seedling and silking stages in Mississippi. **Plant Disease** 67:1366-1368.

WRIGHT, J.E; KNAUF, T.A. Evaluation of Naturalis-L for control of cotton insects. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE, PESTS AND DIASES, 3., Brighton, 1994. **Proceedings**. Brighton, 1994. P.45-52.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989.

XAVIER, L. M. S.; ÁVILA, C. J. Patogenicidade, DL 50 e TL 50 de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok para o percevejo castanho das raízes *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, n. 35, p. 763-768, 2005.

ZAWADNEAK, M.A.C., R.B. GONÇALVES, I.C. PIMENTEL, J.M. SCHUBER, B. SANTOS, A.S. POLTRONIERI & M.A. SOLIS, 2016. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia** 34: 91-95.

ZAWADNEAK, M.A.C., H.R. VIDAL & B. SANTOS, 2015. Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae), p. 216- 231. In: Vilela, E. & R.A. Zucchi (Eds). **Pragas Introduzidas: Insetos e Ácaros**. Piracicaba (Brasil), FEALQ, 908 p.

ZAWADNEAK, M.A.C., M. Botton, J.M. SCHUBER, B. SANTOS & H.R. VIDAL, 2014. **Pragas do morangueiro**, p. 101-145. In: Zawadneak, M.A.C., J.M. Schuber & Á.F. Mógor (Eds). **Como produzir morangos**.

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

ZAWADNEAK, M.A.C., R.B. GONÇALVES, T.M.A. KUHN, E. DOLCI, C.S. ROCHA, B. SANTOS, A. BENATTO & H.R. VIDAL, 2011. NOVO DESAFIO. **CULTIVAR HF**, 9: 24-26.

ANEXO 1 – TESTE ESTATISTICO (ANOVA E TUKEY)

Variável analisada: Mortalidade

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	8	2010.707237	251.338405	2.604	0.0148
Repetições	9	497.893143	55.321460	0.573	0.8147
erro	71	6853.041972	96.521718		
Total corrigido		88	9361.642353		
Média geral:	CV (%) =	140.30			
	7.0026966	Número de observações:		89	

Teste Tukey para a FV Tratamentos

DMS: 14,145891297619 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 9,8780487804878
 Erro padrão: 3,12591337162887

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
H	3.363000	a1
C	3.379000	a1
D	3.563000	a1 a2
I	4.877778	a1 a2
Controle	5.333000	a1 a2
G	5.375000	a1 a2
F	5.979000	a1 a2
E	13.363000	a1 a2
B	17.579000	a2