

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL – UCS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA – IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO
AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DA LAGARTA-
ENROLADEIRA-DA-MACIEIRA *Bonagota salubricola* (MEYRICK)
(LEPIDOPTERA, TORTRICIDAE)

FRANSOÊ ALAN ANHALT

Caxias do Sul, 2008.

FRANSOÊ ALAN ANHALT

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO DA LAGARTA-ENROLADEIRA-DA-MACIEIRA**

***Bonagota salubricola* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA, TORTRICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Specht

Caxias do Sul, 2008

FRANSOÊ ALAN ANHALT

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO DA LAGARTA-ENROLADEIRA-DA-MACIEIRA**

Bonagota salubricola (MEYRICK) (LEPIDOPTERA, TORTRICIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Specht

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21 DE NOVEMBRO DE 2008.

Dra. Neiva Monteiro de Barros

Dr. João Lúcio de Azevedo

Dr. Alexandre Specht

Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

Dra. Regina Lúcia Sugayama

Aos meus pais, Francisco Anhalt e Salete Maria Anhalt.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francisco Anhalt e Salete Maria Anhalt, por acreditarem em mim, pela ajuda e amor;

A minha namorada, Marina Foresti, por sempre me incentivar, ser compreensiva dando-me a certeza de ter aquela âncora que nos dá o sentido de lar, de que chegou em casa, de ser esperado e amado;

À Prof^ª. Dr^ª. Neiva Monteiro de Barros pela orientação, amizade e compreensão, confiando-me uma oportunidade especial;

Ao Prof. Dr. Alexandre Specht pela atenção e auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Controle de Pragas e Doenças de Plantas, Lúcia Vargas, Ana Carolina, Wilson Castro, Aline Formentini, Valdirene Sartori, Francine Albrecht, Caroline Dal Piaz, Vânia Rech, Stefani Giani, Camila Miguel, Eloísa Marchetto e Bruna Locateli, por sempre colaborarem de bom grado;

À Marielsa e Rosângela, responsáveis pela sala de esterilização;

À Marilena Aquino Muro pelo incentivo e por revisar esta dissertação;

À CAPES pela bolsa concedida;

À UCS pela oportunidade e incentivo à pesquisa;

À AGROPEC, pela técnica de criação e exemplares de *B. salubricola*;

Aos Professores Doutores João Lúcio de Azevedo, Rute Terezinha da Silva Ribeiro e Regina Lúcia Sugayama por aceitarem fazer parte de minha banca de avaliação;

Pela proteção divina.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Importância econômica e principais pragas da macieira	2
2.2 Controle de <i>Bonagota salubricola</i>	5
2.3 O Papel das enzimas no processo infectivo	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Microrganismos testados	13
3.2 Meios de cultura e soluções	13
3.3 Criação e manutenção de <i>B. salubricola</i>	16
3.4 Bioensaios em laboratório	16
3.4.1 Testes de patogenicidade	16
3.4.2 Testes de virulência	17
3.5 Atividade proteolítica	18
3.5.1 Atividades enzimáticas (PROTEASES Pr1 E Pr2)	18

3.6 Compatibilidade entre fungo e inseticidas químicos	19
3.7 Análise estatística dos dados	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Patogenicidade	22
4.2 Virulência	23
4. Efeitos dos fungos entomopatogênicos sobre mortalidade pupal e larval de <i>B. salubricola</i>	33
4.4 Atividade Proteolítica	36
4.5 Compatibilidade entre fungos e inseticidas	41
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de fungos entomopatogênicos empregadas em bioensaios para avaliação da patogenicidade às larvas de <i>B. salubricola</i> , identificação dos fungos, hospedeiro original e localidade de origem	13
Tabela 2 – Constituintes do ensaio para atividade enzimática – proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2)	19
Tabela 3 - Mortalidade média acumulada de 50 lagartas de <i>B. salubricola</i> em ensaios com diferentes concentrações de fungos no segundo instar	32
Tabela 4 - Avaliação da atividade proteolítica de <i>Beauveria</i> e <i>Metarhizium</i> do tipo-subtilisina (Pr1) em MMI e MMI+CAS	38
Tabela 5 – Teste de compatibilidade entre a linhagem E6 (<i>M. Anisopliae</i>) e os respectivos tratamentos após 10 dias de incubação	42

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Mortalidade percentual de lagartas de <i>B. salubricola</i> expostas a <i>Beauveria</i> sp. (AS), <i>M. anisopliae</i> (AL, CG46 e E6) na concentração de 2×10^7 com/mL, no segundo ínstar	23
Fig. 2. Percentual de mortalidade acumulada de lagartas de <i>B. salubricola</i> tratadas com diferentes concentrações de <i>Beauveria</i> sp. (AS), <i>M. Anisopliae</i> (AL, CG46 e E6) no segundo instar	24
Fig. 3. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de <i>B. salubricola</i> tratadas com diferentes concentrações do fungo <i>Beauveria</i> sp. (Linhagem AS)	25
Fig. 4. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de <i>B. salubricola</i> tratadas com o fungo <i>M. anisopliae</i> (Linhagem AL)	27
Fig. 5. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de <i>B. salubricola</i> tratadas com diferentes concentrações do fungo <i>M. anisopliae</i> (Linhagem CG46)	28
Fig. 6. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de <i>B. salubricola</i> tratadas com diferentes concentrações do fungo <i>M. anisopliae</i> (Linhagem E6)	29
Fig. 7. Percentual de mortalidade de lagartas de primeiro ínstar de <i>B. salubricola</i> tratadas com diferentes concentrações do fungo <i>M. anisopliae</i> (Linhagem E6)	29
Fig. 8. Percentual de mortalidade de lagartas de quarto ínstar de <i>B. salubricola</i> tratadas com diferentes concentrações do fungo <i>M. anisopliae</i> (Linhagem E6)	31
Fig. 9. Percentual de sobrevivência pupal de <i>B. salubricola</i> de acordo com as linhagens AS (<i>Beauveria</i> sp.), AL, CG46 e E6 (<i>M. anisopliae</i>) com os diferentes tratamentos	34
Fig. 10. Atividade de protease tipo-subtilisina (Pr1), das linhagens (AS, BA95 e CG166) de <i>B. bassiana</i> a cada 24h	37
Fig. 11. Atividade de protease tipo-subtilisina (Pr1), das linhagens (CG46, E6 e AL) de <i>M. anisopliae</i> a cada 24h	38
Fig. 12. Atividade de protease tipo-tripsina (Pr2), da linhagem E6 de <i>M. anisopliae</i> e da linhagem CG166 de <i>B. bassiana</i> a cada 24h	39
Fig. 13. Crescimento vegetativo da linhagem E6 (<i>M. anisopliae</i>), associados com os respectivos tratamentos após 10 dias de incubação	42

RESUMO

A macieira é depreciada por muitos insetos, principalmente pela lagarta-enroladeira-da-macieira *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae). Até o momento seu controle nos pomares comerciais é feito quase exclusivamente com inseticidas químicos. Alternativamente, este trabalho teve por objetivo verificar a mortalidade *in vitro* de larvas de segundo instar de *B. salubricola* frente a ação de isolados dos fungos *Nomuraea*, *Beauveria* e *Metarhizium*. Cada grupo foi tratado com suspensões de 2×10^5 a 2×10^9 con/mL, exceto para o grupo controle, tratado com solução Tween-80 0,1%. Também avaliou-se a sobrevivência pupal, expressão de proteases e a compatibilidade com inseticidas químicos. Uma das linhagens de *Beauveria* e as três de *Metarhizium* foram patogênicas a *B. salubricola*, sendo que os níveis de virulência aumentaram em função da concentração de conídios. A linhagem E6 de *M. anisopliae* destacou-se por proporcionar um controle de até 88% com TL₅₀ de 1,66 dias; a maior virulência relacionou-se positivamente com o aumento da produção enzimática, sendo esta linhagem também compatível com tebufenozide. Esses resultados evidenciam o potencial dos fungos entomopatogênicos no controle de *B. salubricola*, visando sua aplicação principalmente nos pomares MIP.

ABSTRACT

The apple tree is deprecated by many insects, especially by leaf-roller-apple *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae). Its control in commercial orchards is done almost exclusively with chemical insecticides. Alternatively, this work aimed at the evaluation of the in vitro susceptibility of larvae of the second instar of *Bonagota salubricola* to isolates of *Nomuraea*, *Beauveria* and *Metarhizium* fungus. Each group was treated with suspensions ranged of 2×10^5 con/mL a 2×10^9 con/mL, except for the control group, treated with solution Tween-80 0.1%. Also was evaluated the pupal survival, expression of proteases and compatibility with chemical insecticides. One strain of *Beauveria* and three strain of *Metarhizium* were pathogenic to *B. salubricola*, and the levels of virulence increased depending of conidia concentration. The strain E6 of *M. anisopliae* stood out for marking a control up to 88% with LT_{50} of 1.66 days, the largest virulence related positively to the increased production enzyme, and this strain was also compatible with tebufenozide. Those results demonstrate the potential of entomopathogenic fungi in control of *B. salubricola*, principally on the orchards IPM.

1. Introdução

A fruticultura de clima temperado é uma atividade em fase de expansão e diversificação no sul do Brasil, em especial no RS e SC. A cultura da macieira destaca-se por apresentar área cultivada de aproximadamente 30.000 ha no Brasil, sendo as cultivares predominantes: Gala, Fuji e Golden Delicious. A safra 2006/2007 ultrapassou a marca de 1 milhão de toneladas, apresentando ainda, demanda não atendida, que requer frutos de qualidade, com características como boa aparência, sabor, textura, durabilidade e redução nas aplicações de agroquímicos.

A macieira hospeda muitos insetos, sendo alguns responsáveis por grandes prejuízos, danificando folhas e principalmente os frutos, impossibilitando ou depreciando sua comercialização. Dentre as principais pragas destaca-se *Bonagota salubricola*, popularmente conhecida como lagarta-enroladeira-da-macieira, atualmente sendo considerada praga primária desta cultura.

Considerando-se a expansão de área plantada com macieiras na região sul do Brasil, a inserção de novos produtores na atividade e restrições quanto ao uso de agrotóxicos, é fundamental que se busquem alternativas para o controle das pragas, especialmente de *B. salubricola*. Para tanto a utilização de microrganismos entomopatogênicos como controladores biológicos constitui uma possível alternativa para reduzir as aplicações de inseticidas químicos melhorando a qualidade dos frutos.

Nesse sentido, objetivou-se avaliar a ação de fungos entomopatogênicos no controle de *Bonagota salubricola*, a atividade proteolítica, e a compatibilidade do fungo mais virulento com agentes químicos rotineiramente utilizados nos pomares comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância Econômica e Principais Pragas da Macieira

A macieira segundo Bleidcher (2002) teve origem nas montanhas da Ásia e no leste da China, e o desenvolvimento das espécies atuais ocorreu provavelmente após a última era glacial, há 20 mil anos. Atualmente já se conhecem cerca de 7 mil variedades de macieiras, mas só aproximadamente 40 têm importância econômica.

A produção brasileira de maçã teve início em 1960, tendo como origem os pomares da Empresa Sociedade Agrícola de Fraiburgo, constituída por acionistas argentinos, brasileiros e franceses (BORGES, 1998). Entretanto, o desenvolvimento comercial iniciou na década de 70, muitas vezes motivado por programas de incentivos e créditos especiais do governo no setor agrícola para o reflorestamento e o plantio de culturas perenes como as plantas frutíferas de clima temperado (GRANDO, 1997).

Após a década de 70 e 80 a produção de maçãs teve significativo crescimento passando de 1.528 toneladas em 1974, para cerca de 980.000 toneladas em 2004 (BONETI et al., 2002; IBRAF, 2006) chegando a 1.093.853 toneladas na safra 2006/2007 (IBGE, 2007).

A macieira é entre as frutíferas de clima temperado a mais exigente em frio, tendo que a maioria das suas cultivares não tem as suas necessidades de frio invernal satisfeitas, apresentando sérios distúrbios fisiológicos, como brotação deficiente e desuniforme e redução da produtividade. O clima portanto é um dos principais fatores realmente limitantes de sua produção e expansão de área plantada (PETRI, 2002). Dessa forma é normal que os

estados mais ao sul do Brasil sejam os responsáveis pela produção nacional; o Rio Grande do Sul responde por 43% e Santa Catarina se mantém como líder com 53% da produção nacional, os estados Paraná e São Paulo dividem os 4% restantes (BONETI et al., 2002).

Cerca de 500 cultivares oriundas de outros países já foram testadas, em especial em Santa Catarina, porém, exceto raras exceções, não se adaptaram as condições climáticas, sendo as cultivares Gala, Fuji e Golden Delicious as mais plantadas e adaptadas ao sul-brasileiro (PETRI, 2002).

O forte ritmo das atividades industriais, despertou uma conscientização de que a natureza não pode absorver todas as atividades humanas, percebendo-se muitas novas questões referentes ao meio ambiente; na agricultura o maior desafio é a substituição do manejo convencional, no geral com usos abusivos de agroquímicos por um sistema racional, que venha a estimular os processos biológicos. Tendo essa concepção em vista, o manejo integrado de pragas passou a receber atenção e a ter aplicabilidade prática, estimulando-se o desenvolvimento de novas pesquisas que possibilitaram o monitoramento das principais pragas, no caso das macieiras deixa-se de fazer aplicações preventivas e realizam-se tratamentos com base no nível populacional das pragas. Os feromônios passam a ter grande importância no monitoramento das pragas. Também obteve-se normatização do uso de inseticidas químicos (PROTAS & SANHUEZA, 2003).

Estima-se que mais de 1 milhão de insetos ocorrem sobre a terra, e que cerca de 10% destes possam ser considerados pragas da agricultura ou urbanas (Alves, 1998). Diversos insetos associam-se a cultura da macieira podendo alguns tornarem-se pragas, entre as quais destacam-se o ácaro vermelho *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae), a mosca-das-frutas, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), a mariposa-oriental *Grapholita molesta*

(Lepidoptera: Tortricidae) e a lagarta-enroladeira-da-macieira *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae).

As lagartas das famílias Noctuidae e Geometridae em especial as espécies *Physocleora dimidiaria* e *Spodoptera eridania*, são pragas secundárias à cultura da macieira, estas podem causar danos pela raspagem dos frutos e pelo desfolhamento (FONSECA & CAYIACHIOLI, 2006).

Atualmente, o gênero *Bonagota* agrupa oito espécies, destacando-se na região sul do Brasil a *Bonagota salubricola*, que apresenta como sinônimo *Bonagota cranaodes* (BROWN & RAZOWSKI, 2003), é nativa da América do Sul ocorrendo também na Argentina e Uruguai (NUNES et al., 2006), popularmente conhecida como lagarta-enroladeira-da-macieira, tem hábito de abrigar-se entre folhas, frutos, cálice ou pedúnculo (KOVALESKI & RIBEIRO, 2003); é considerada praga primária da cultura da macieira (KOVALESKI et al., 1998) e, tanto no sul do Brasil como no Uruguai, tem sido também encontrada danificando videiras (NUÑES et al., 1998). A lagarta alimenta-se principalmente da casca e polpa inutilizando os frutos (maçã) para comercialização (GALLO et al., 2002). Segundo Ribeiro (1999), as áreas sul brasileiro mais infestadas, encontram-se nos municípios de Vacaria e São Joaquim, por serem os principais pontos de produção de maçãs.

O período médio de incubação dos ovos é de 8 dias, a fase larval, com cinco ínstaes, apresenta em média 3,66; 3,83; 3,42; 3,57 e 4,42 dias (PARRA et al., 1995). A larva completamente desenvolvida mede de 15 a 18 mm de comprimento e sua cor varia desde verde-claro até branco ou marrom-esbranquiçado. As pupas são levemente esverdeadas tornando-se marrom-escuras próximo a emergência do adulto. O adulto é uma mariposa que mede em torno de 16 mm de envergadura e 7 mm de comprimento. O corpo e as asas têm coloração escura apresentando uma faixa clara no terço apical da asa, a fêmea ovoposita em

massa na face adaxial da folha da macieira. A duração do ciclo (ovo até adulto) em condições de laboratório sob temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, é de 44,6 dias (RIBEIRO, 1999).

2.2 Controle de *Bonagota salubricola*

O manejo para o controle de insetos na macieira é bastante dificultado, em razão de seus hábitos e comportamentos. As lagartas de *B. salubricola* abrigam-se em cartuchos formados por folhas ou no cálice de frutos (Botton et al., 2000a).

Seu monitoramento em pomares comerciais é feito com armadilhas de feromônio sexual que atraem o macho para o acasalamento, o atrativo dura de 60 a 90 dias, utilizando-se uma armadilha para cada 3 a 5 ha (RIBEIRO, 1999).

O controle dos insetos-praga é realizado, quase que exclusivamente, com inseticidas químicos, cujo número de tratamentos vem aumentando em função da elevação dos níveis populacionais destas pragas; anualmente são realizadas até oito pulverizações com inseticidas fosforados visando o controle de *B. salubricola* e mesmo assim, perdas de 3 a 5% são mantidas (KOVALESKI et al., 1998). A recomendação é que se utilizem inseticidas químicos quando forem encontrados 20 ou mais insetos/armadilha/semana (RIBEIRO, 1999).

Os inseticidas recomendados são azinfós-etílico, cabaryl, chlorpyrifos, deltamethion, phosmet, tebufenozide, trichorfon (RIBEIRO, 1999) diflubenzuron, fenitrothion e metidation (Gallo et al., 2002). Além disso, são efetuadas aplicações de outros agrotóxicos, principalmente fungicidas e herbicidas. O uso abusivo de agrotóxicos aumenta a possibilidade de ocorrer resistência de pragas, apresentando alta toxicidade contra os inimigos naturais (MONTEIRO, 1993; FARIAS et al., 2004).

Estudos sobre o controle químico de *B. salubricola* foram realizados em laboratório, sem a confirmação da eficiência dos mesmos a campo. Com base nestes trabalhos, verificou-

se que o controle das lagartas exercido pelos inseticidas fosforados foi de 40% a 50%, e com piretróides o controle foi superior a 90% (Kovaleski, 1994), porém estes, normalmente provocam desequilíbrios no pomar, favorecendo o ataque do ácaro-vermelho-europeu, *Panonychus ulmi*, (Orth et al., 1986).

A cultura da macieira é altamente dependente das abelhas (*Apis mellifera*) por ter seu papel como polinizadora estimado em mais de 90%, sendo colméias rotineiramente alugadas durante o período de floração. Cerca de 2,5 colméias/ha são necessárias/suficientes para visitar as flores do pomar, dificultando o controle químico de pragas, pois grande parte dos agrotóxicos utilizados não é seletivo, causando possivelmente sérios danos às colméias quando atingidas (PARANHOS., et al 1998 e FARIAS et al., 2004).

Tendo em vista todo ciclo produtivo, tanto de maçãs como de outras frutíferas, as tendências do mercado mundial apontam para uma forte preferência por produtos naturais, reduzindo a utilização de agrotóxicos. Uma das medidas adotadas pelos fruticultores foi o PIF (produção integrada de frutas), e especificamente o PIM (produção integrada de maçã). Para tanto são preconizadas ações que visam conservar os inimigos naturais das pragas, entre elas o uso de agrotóxicos seletivos. Segundo Kovaleski (2004) e Protas e Sanhueza (2003), é provável que após algumas safras com menor volume de aplicações de agrotóxicos, seja favorecido o controle biológico natural; possibilitando um melhor equilíbrio ecológico favorecendo a recuperação e o ressurgimento de organismos benéficos importantes aliados na luta biológica e na viabilidade de um sistema de produção menos dependentes de insumos químicos (KOVALESKI & RIBEIRO, 2003). Cerca de 60% da área plantada com macieiras no Brasil já estão sob o regime PIF (Faria & Martins, 2002).

Entre os inimigos naturais, os parasitóides de ovos da família Trichogrammatidae, em especial do gênero *Trichogramma*, estão associados a diversas espécies de insetos-praga em

diferentes cultivos (Pinto, 1997). No sul do Brasil, Lorenzato (1988) mencionou o parasitismo de *Trichogramma* sp. em ovos da lagarta-enroladeira-da-macieira. Mais recentemente, Monteiro et al., (2004) também relataram o parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), em posturas do mesmo lepidóptero, em pomares comerciais de macieira, sendo aproximadamente 6,6% das posturas parasitadas e destas cerca de 22% dos ovos. Pastori et al., (2007) mencionaram o parasitismo de *T. pretiosum*, chegando a índices de 88% dos ovos parasitados em laboratório.

Alternativamente, a utilização de agentes naturais tais como fungos (AZEVEDO, 1998) pode diminuir o emprego de produtos químicos. O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos iniciou em torno de 1950, com a possibilidade de manipular microrganismos para causar epizootias em insetos suscetíveis, a velocidades próximas àquelas dos produtos químicos, sem, contudo, causar danos às espécies benéficas (ALVES, 1998). O controle microbiológico de pragas trata da utilização racional de microrganismos entomopatogênicos visando a manutenção da população das pragas em níveis não prejudiciais (GALLO et al., 2002), constituindo-se em alternativa eficaz e viável no combate de pragas (ROBBS & BITTENCOURT, 1998).

A utilização de entomopatógenos como alternativa para minimizar o uso de agroquímicos ou para sua substituição tem avançado rapidamente, com os primeiros testes efetivados no final do século XIX (FARIA & MAGALHÃES, 2001), hoje vários são conhecidos e já estão sendo usados. O controle microbiano representa um ramo do controle biológico que consiste na utilização racional de patógenos, que apresentam vantagens em relação aos inseticidas químicos de largo espectro, pois mantém populações de parasitóides, predadores e polinizadores, não poluem o ambiente e não são tóxicos para o homem e outros animais (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são considerados organismos-chave na regulação de populações de insetos-praga, sendo promissores como agentes de controle microbiológico de insetos (PRIOR, 1992; ALVES, 1998). A ocorrência de fungos, em condições naturais, tanto enzootias como epizootias, vem sendo um fator importante na redução das populações de pragas. Gêneros de fungos entomopatogênicos como *Metarhizium* e *Beauveria* são utilizados há alguns anos no controle biológico de insetos-praga na agricultura (AZEVEDO, 1998).

Existem algumas particularidades no emprego de fungos como agentes de controle microbiano: ação lenta em matar o inseto; cuidados no armazenamento visando a manutenção da viabilidade e virulência, bem como a necessidade de condições ambientais favoráveis para seu emprego (temperatura, umidade, luminosidade e radiação) (ALVES, 1998).

O requisito primário para o emprego de um fungo entomopatogênico como biopesticida, é a suscetibilidade da praga ao fungo, que depende da seleção de uma linhagem estável, com características e eficácia específica, como de penetração rápida, colonização e morte do hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Esses agentes foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano, sendo responsáveis por aproximadamente 80% das etiologias dos insetos. São conhecidos aproximadamente 90 gêneros com mais de 700 espécies, destes cerca de 20 gêneros incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998).

Os principais fungos entomopatogênicos conhecidos pertencem aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Aschersonia*, *Paecilomyces* e *Entomophthora* (AZEVEDO, 1998; FARIA & MAGALHÃES, 2001), sendo que o gênero *Metarhizium* compreende o grupo mais bem estudado, particularmente a espécie *M. anisopliae*.

O gênero *Metarhizium* tem sido reconhecido desde 1879 como um promissor agente de controle biológico de insetos-praga, sendo considerado um dos poucos fungos com potencial para comercialização (GUPTA et al., 1991). *Metarhizium* spp. é amplamente distribuído na natureza ocorrendo sobre mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens, pode ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos. Os insetos infectados apresentam micelio branco, que quando esporula mostra tons de verde claro a escuro ou acinzentados (ALVES, 1998). *M. anisopliae* tem demonstrado por exemplo, uma alta eficiência no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino (ONOFRE et al., 2002; BITTENCOURT et al., 1999), e em seus ovos, (ALVES, 1998; BITTENCOURT et al., 1994), em percevejos do gênero *Blissus* (SAMUELS & CORACINI, 2004), do percevejo *Scaptocoris carvalhoi* (XAVIER & ÁVILA, 2006) cupins *Cornitermes cumulans* (NEVES & ALVES, 2004), do pulgão *Tibraca limbativentris* (RAMPELOTTIL et al., 2007), da mosca *Anastreha fraterculus* (DESTÉFANO et al., 2005) de cigarrinhas das pastagens (gêneros *Deois*, *Zulia* e *Mahanarva*) (ALMEIDA et al., 2003b; ALVES, 1998).

O gênero *Beauveria* infecta um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros. Os indivíduos infectados apresentam-se cobertos por micélio branco que esporula em condições adequadas de umidade e luz. Em condições de laboratório, pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que a campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica em coleópteros, lepidópteros, hemípteros e menos comumente em ortópteros (ALVES, 1998). Tem sido utilizado para controle de insetos-praga como a broca *Chilo partellus* (MANIANIA, 1993), a mosca Tsé-tsé, *Glossina morsitans morsitans* (KAAYA, 1989; KAAYA & OKECH, 1990; KAAYA & MUNYINYI, 1995), o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (SILVA, 2001), a broca-gigante-da-cana-de-açúcar *Castnia licus*, verificando-se índices elevados de mortalidade contra estas pragas (FIGUEIREDO et

al., 2002), em percevejos do gênero *Blissus* (SAMUELS & CORACINI, 2004), do percevejo *Scaptocoris carvalhoi* (XAVIER & ÁVILA, 2006), cupins *Cornitermes cumulans* (NEVES & ALVES, 2004).

O gênero *Nomuraea* tem o solo como um dos maiores reservatórios de inóculos, ocorre em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleoptera, Orthoptera e Lepidoptera com cerca de 90% dos hospedeiros. De modo geral, o fungo atua melhor em variedades de plantas com maior massa foliar e em culturas fechadas (ALVES, 1998). É encontrado parasitando a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (ALVES, 1998; DAIGLE et al., 1990), *Spodoptera litura* (DEVI, 1994), *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Peridroma saucia*, *Pseudoplusia includens*, *Trichoplusia ni* (ALVES, 1998; MARUYA et al., 2001).

Apesar dessa grande potencialidade de utilização dos fungos entomopatogênicos sobre insetos até o momento não foi testada sua ação contra *B. salubricola*.

2.3 O papel das enzimas no processo infectivo

A cutícula, que faz parte do exoesqueleto dos insetos, funciona como uma significativa barreira ao meio externo, conseqüentemente à penetração dos fungos entomopatogênicos (CLARKSON & CHARLEY, 1996). A epicutícula dos insetos é composta por lipídios (95%), aminoácidos e aminoaçúcares que servem com fonte de nutrientes para germinação do fungo. Já na procutícula as proteínas predominam (61%), seguidas de quitina (30%) e lipídios (7%) (St. LEGER et al., 1988; SAMSINAKOVA et al., 1971).

Para a maioria dos fungos entomopatogênicos a penetração ocorre via tegumento. A adesão depende da presença de enzimas (esterases e proteases) que ocorrem na superfície dos

conídios não germinados alterando o tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e germinação do fungo (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são potencialmente os mais versáteis, pois diferente da maioria dos outros patógenos, os quais precisam ser ingeridos para iniciar a doença, usualmente invadem o inseto penetrando pela cutícula externa (GOETTEL et al., 1995), são capazes de infectar artrópodes de vários ambientes e em diferentes idades e estágios (McCOY & MILANI-TIGANO, 1996). Para ser efetivo como agente de biocontrole, o fungo deve penetrar no inseto, a etapa inicial de infestação se dá pela adesão e germinação de conídios do fungo na superfície do inseto, seguida de penetração da hifa, envolvendo dois processos principais: o físico, devido à pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e o químico, resultante da produção de enzimas (proteases, quitinases e lipases), as quais facilitam a penetração mecânica (EL-SAYED et al., 1991; EL-SAYED et al., 1993; ALVES, 1998). Alguns produzem uma estrutura denominada apressório, que corresponde a uma dilatação da hifa onde normalmente ocorre grande atividade enzimática que degrada a cutícula e possibilita penetrar no inseto, outros formam uma massa mucilaginosa ao redor do tubo germinativo, a qual também teria função de adesão e produção de enzimas (ALVES, 1998; BOUCIAS & PENDLAND, 1991; SRISUKCHAYAKUL et al., 2005).

A produção de enzimas tem sido estudada com várias finalidades, como processos de especificidade, patogenicidade e virulência, no entanto nem sempre é possível fazer esta correlação, sendo que a morte do inseto ocorre em função de uma série de eventos, podendo envolver desde as condições climáticas, até espécie de inseto e linhagem de fungo (ALVES, 1998). O papel das enzimas, principalmente das proteases, está envolvido com a penetração e infecção de insetos por fungos, na hidrólise de componentes cuticulares (predominantemente proteínas) facilitando a penetração das hifas, sendo que o tipo de substrato influencia na

expressão enzimática.

O complexo natural de resistência dos insetos sugere uma ação sinérgica de várias enzimas, destacando as proteases como críticas no processo de infecção do hospedeiro (CLARKSON & CHANRLEY, 1996). Duas proteases foram caracterizadas em sobrenadante do meio de cultivo, a Pr1 com atividade tipo-subtilisina e a Pr2 com atividade tipo-tripsina. A Pr1 segundo St. LEGER et al., (1989), é uma protease muito importante na entomopatogenicidade pois é capaz de degradar uma ampla variedade de proteínas. Com relação a Pr2 PATERSON et al., (1994) relataram que a mesma está envolvida na ativação ou indução de Pr1. Segundo St. LEGER et al., (1996) enzimas do tipo Pr2 são secretadas por estruturas de infecção (apressório) na superfície da cutícula de *M. sexta* e pela hifa penetrante, sugerindo que esta enzima deve ter papel complementar ao de Pr1 na degradação de proteínas cuticulares. Porém Pr2 não segue o mesmo padrão de Pr1, sua expressão não é específica. PINTO et al. (2002) não verificaram a influencia positiva de Pr2 em presença de cutícula no meio.

Existem evidências da ação conjunta do pH e a indução pela cutícula para produção de Pr1 e Pr2, verificando-se diferentes expressões em respostas ao pH do ambiente. Sendo estas enzimas influenciadas principalmente pelo substrato e pH, que podem induzir ou não sua expressão (St. LEGER et al., 1988).

SCHRANK & VAINSTEIN (2004) mostraram que a super-expressão de uma das proteases aumenta a eficiência de infecção de *M. anisopliae* em ensaios com *Boophilus microplus*.

GUPTA et al., (1994) demonstraram a existência de correlação entre os níveis de quitinases e proteases tipo-Pr1 produzidas por diferentes linhagens de *B. bassiana* e sua

virulência, relatando que altos níveis desta enzima parecem estar relacionados com um menor tempo de mortalidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS TESTADOS

Os microrganismos utilizados neste trabalho, bem como os seus hospedeiros e região de origem estão elencados na Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de fungos entomopatogênicos empregadas em bioensaios para avaliação da patogenicidade às larvas de *B. salubricola*, identificação dos fungos, hospedeiro original e localidade de origem.

Fungos/Linhagens	Hospedeiro	Local de origem
<i>Beauveria</i> sp. (Ba95)	<i>Zea mays</i> (Endofítico)	Curitiba/PR
<i>Beauveria bassiana</i> (CG166)	<i>Schirius</i> spp. (Coleoptera)	Curitiba/PR
<i>Beauveria bassiana</i> (AS)	<i>Trichoplusia ni</i> (Lepidoptera)	Salvador do Sul/RS
<i>Metarhizium asisopliae</i> (A1)	<i>Mahanarva posticata</i> (Hemiptera)	Alagoas
<i>Metarhizium anisopliae</i> (CG46)	<i>Deois incompleta</i> (Hemiptera)	Pernambuco
<i>Metarhizium anisopliae</i> (E6)	<i>Deois flavopicta</i> (Hemiptera)	Espírito Santo
<i>Nomuraea rileyi</i> (Sr86151)	<i>Rachiplusia nu</i> (Lepidoptera)	Santa Rosa / RS
<i>Nomuraea rileyi</i> (Va9101)	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera)	Vacaria / RS
<i>Nomuraea rileyi</i> (Sa86101)	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera)	Sarandi / RS

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Meio BDA, Batata-dextrose-agar. Utilizado para *Metarhizium spp.* e *Beauveria spp.*

(300g de batatas, 20g de dextrose e 15g de agar, completa-se o volume para 1L com água destilada), pH 6,0.

Meio SMAY, utilizado para *Nomuraea spp.* (10g de peptona, 40g de maltose, 10g de extrato de levedura, 20g de agar, completa-se o volume pra 1L com água destilada), pH 6,0.

Meio Mínimo (MM) PONTECORVO et al., 1953)

(NaNO₃ 6 g, KH₂PO₄ 1,5 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, KCL 0,5 g, FeSO₄ 0,001 g, completa-se o volume com água destilada para 1L).

- O pH deste meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% (p/v).

- Para obtenção do MMI solidificado foram adicionadas 12g de agar por litro.

O MMI corresponde ao MM sem adição de NaNO₃ e glicose.

Solução Salina (0,85%) - Preparou-se uma solução de 8,5g de NaCl em 1000 mL de água destilada. Um volume de 9 mL foi distribuído em frascos com tampa rosqueavel, os quais posteriormente foram autoclavados e mantidos a temperatura ambiente.

Solução de Tween 80 0,1% (v/v) - Foram adicionados 0,1 mL de Tween 80 (polioxietilensorbitano monooleato) em 99,9 mL de água destilada com homogeneização e alíquotas de 10 mL da solução foram colocados em tubos com tampas rosqueaveis, posteriormente autoclavados e mantidos a temperatura ambiente.

Solução de Hidróxido de Sódio 8% – Hidróxido de sódio 8g, completando o volume para 100 mL com água destilada.

Solução de Caseína 1% - Foram adicionados, sob agitação, 2g de caseína (não

hidrolisada) a 100mL de NaOH 0,05M. Após completa dissolução, o pH foi ajustado para 6,0 com H₃PO₄ 0,05N e os volumes completados para 200mL com água destilada. A solução foi adicionada a 800mL de MMI para obtenção de **MMI + CAS** (caseína).

Solução de Hidróxido de Sódio 0,05N – hidróxido de sódio 2g completando o volume para 1000mL com água destilada.

Solução de Ácido Orto-Fosfórico 0,5N – ácido orto-fosfórico 14,45mL completando o volume para 1000mL com água destilada.

Tampão Tris-HCl 15mM (pH 7) – Trisma-base 0,726g, 100mL com água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 com HCl concentrado. O volume final da solução foi completado para 200mL com água destilada e autoclavada.

Substrato de Proteases Tipo-Subtilisina (Pr1) 1mM – Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida 0,0125g dissolvido em 1mL de DMSO, em seguida o volume completado para 20mL com água destilada.

Substrato de Proteases Tipo-Tripsina (Pr2) 1 mM – N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida 0,0136g, dissolvido em 1mL de DMSO, em seguida o volume foi completado para 20mL com água destilada.

Ácido Acético 30% – 30mL de ácido acético completando o volume para 100mL com água destilada.

3.3 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE *B. salubricola*

A criação de *B. salubricola* foi iniciada a partir de posturas obtidas junto à empresa AGROPEC e EMBRAPA UVA E VINHO, Vacaria, RS. Os insetos foram mantidos em insetário, sob condições controladas de temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 horas e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. A alimentação das lagartas constou de dieta artificial composta de feijão, levedo de cerveja, vitaminas e sais minerais (PARRA et al., 1995).

As lagartas foram mantidas, em grupos de 10 a 20 exemplares, em copos plásticos transparentes com 15 cm de altura e 7 cm de diâmetro, contendo dieta artificial. As pupas foram mantidas em placas de petri até a emergência dos adultos. As mariposas foram acondicionadas em gaiolas (30x30x30cm) de madeira (cobertas com tecido voal), a alimentação dos adultos constou de uma dieta composta de 75% de solução aquosa de mel a 10% e 25% de cerveja, oferecida em chumaço de algodão, trocado diariamente.

3.4 BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO

3.4.1 TESTES DE PATOGENICIDADE

Foram realizadas avaliações da patogenicidade das linhagens (Tab. 1) à *Bonagota salubricola*. Em cada avaliação foram utilizadas 30 lagartas de segundo ínstar, agrupadas em 3 repetições com 10 indivíduos.

Os ensaios foram mantidos em estufa incubadora B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60\% \pm 10\%$ U.R. e 12 horas de fotofase.

Uma alíquota de 2mL de solução contendo 10^7 esporos por mL, foi adicionada a um disco de papel filtro medindo 9cm de diâmetro, disposto na porção interna das placas de Petri, onde foram acondicionadas as lagartas. Como controle foi mantida a mesma metodologia exceto por não utilizar o microrganismo. Após 24 horas do início do ensaio as lagartas foram transferidas para dieta artificial livre de microrganismos, sendo a mortalidade avaliada até a fase pupal.

3.4.2 TESTES DE VIRULÊNCIA

Foram selecionados os fungos patogênicos a *B. salubricola* sendo re-isolados seguindo metodologia descrita em (ALVES, 1998). Destes, foram utilizados conídios de primeiro repique com 10 a 12 dias de crescimento.

Nos bioensaios foram utilizadas lagartas de segundo instar, entretanto para a linhagem mais virulenta foram realizados testes complementares com lagartas de primeiro e quarto ínstares.

Os conídios foram agitados em solução de Tween 80 0,1% (v/v) com diluições

seriadas em solução salina 0,85%. Foram preparadas suspensões de 10^5 a 10^9 conídios por mL, destas suspensões foram pipetados 2,5mL para aplicação em papel filtro que foi disposto em placas de Petri 9 cm de diâmetro. Após evaporação do excesso de umidade, as lagartas foram colocadas sobre este por um período de 24 horas e após transferidas para dieta artificial livre de microrganismos, sendo mantidas sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. A mortalidade foi avaliada diariamente até a fase pupal.

Para os grupos controle, os procedimentos foram idênticos exceto pelo fato de não serem utilizados os microrganismos testados.

Foram feitas 5 repetições por tratamento com 10 lagartas por repetição.

3.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Foram selecionados para os testes, gêneros de microrganismos em que pelo menos uma das linhagens testadas provocou sensibilização à *B. salubricola*.

As linhagens foram revigoradas através de repiques do fungo em MM+CAS sólido para obtenção de conídios.

Para cada isolado, 1mL de uma suspensão de $5,6 \times 10^6$ conídios/mL foi inoculada em 25mL de MMI (Meio mínimo de indução enzimática) e 25mL de MMI+CAS (Meio mínimo de indução enzimática acrescido de solução de caseína 1% p/v). Os frascos foram mantidos a 28°C sob agitação (180 rpm). As amostras foram retiradas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. Inoculou-se um frasco para cada amostra, sendo cada amostra feita em triplicata.

As amostras foram centrifugadas a 2240g por 10 minutos para separar o sobrenadante do micélio. O sobrenadante foi mantido a -20°C e usado como fração enzimática secretada nos ensaios enzimáticos das proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2).

3.5.1 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS (PROTEASES Pr1 e Pr2)

Atividades tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) foram determinadas utilizando substratos sintéticos específicos: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida e N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida, respectivamente, segundo GUPTA et al. (1992).

O método utilizado para determinação enzimática sobre estes substratos baseou-se na sua hidrólise com a liberação de *p*-nitroanilida, no comprimento de onda de 410nm, o que permite a medida espectrofotométrica do grau de hidrólise destes substratos. A determinação da atividade enzimática dos sobrenadantes foi realizada utilizando tubos em duplicata conforme Tabela 2.

Tabela 2. Constituintes do ensaio para atividade enzimática – proteases tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2).

Tubos	Tris - HCl 15 mM pH 7,0	H ₂ O	Substrato 1 mM	Sobrenadante
Controle	850 µL	50 µL	---	100 µL
Branco	850 µL	100 µL	50 µL	---
Teste	850 µL	---	50 µL	100 µL

Controle: amostra sem substrato;

Ausência: ---

Os tubos foram mantidos a 28°C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 250µL de ácido acético 30% e os tubos foram mantidos em banho de gelo por 15 minutos. Após 10 minutos de repouso foi realizada a leitura da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmols de *p*-nitroanilida por minuto.

3.6 COMPATIBILIDADE ENTRE FUNGO E INSETICIDAS QUÍMICOS

A linhagem fúngica mais virulenta foi submetida a um teste de compatibilidade com quatro inseticidas químicos amplamente utilizados em diversas culturas e recomendados para o manejo integrado de pragas em macieiras. Foram utilizados, Clorpirifós-etil (Lorban 480BR - 72g de ia/100L), Methidathion (Supracid 400CE - 60g de ia/100L), Tebufenozide (Mimic 240SC - 21,6g de ia/100L) e Fenitrotiom (Sumithion 500 CE - 75 g de i.a./100 L).

O efeito dos produtos fitossanitários sobre os fungos foi estudado *in vitro* avaliando-se o crescimento vegetativo e a esporulação dos entomopatógenos na presença de cada agrotóxico testado. A adição dos produtos foi feita em meio de cultura ainda líquido ($45\pm 5^{\circ}\text{C}$), sendo vertidos em alíquotas de 20 mL em placas de Petri (9 cm de diâmetro). A inoculação dos fungos entomopatogênicos foi feita com alça de platina, em três pontos por placa, equidistantes entre si. Foram 12 inoculações por tratamento e as placas mantidas em estufa (BOD) a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, com umidade de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, por 10 dias. Para o grupo controle utilizou-se a mesma metodologia, exceto pela não adição dos agroquímicos.

O crescimento vegetativo foi medido através do diâmetro das colônias com paquímetro digital em três sentidos, sendo considerado a média das três medidas. O número de esporos foi estimado cortando-se um disco com 13 mm de diâmetro em cada ponto de inoculação, transferidos para tubo de vidro contendo 10mL de solução Tween 80 (0,1% v/v), agitando-se por 5 minutos. A estimativa do número de esporos foi feita em câmara de Neubauer.

Os dados obtidos foram submetidos a um fator de compatibilidade (Valor "T"), proposto por ALVES et al. (1998), que permite a separação dos produtos em classes de seletividade/compatibilidade.

O cálculo desse índice foi feito através da fórmula

$T = 20 [CV] + 80 [ESP] / 100$, onde: T = valor corrigido para classificação do produto;
CV= porcentagem de crescimento vegetativo em relação à testemunha;
ESP= porcentagem de esporulação (conidiogênese) em relação à testemunha.

Os valores calculados de "T" foram comparados com os seguintes limites estabelecidos: 0 a 30 = muito tóxico; 31 a 45 = tóxico; 46 a 60 = moderadamente tóxico; > 60 = compatível.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os percentuais médios de mortalidade acumulada foram comparados por análise de variância (ANOVA) cujas médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade.

A virulência foi avaliada pelo método de PROBIT (Finney, 1971), determinando CL_{50} e TL_{50} .

A correlação entre concentrações e mortalidade foi avaliada pelo teste de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos entomopatogênicos demonstraram particularidades quanto à capacidade em parasitar *B. salubricola*, assim como sua atividade enzimática e compatibilidade com produtos químicos.

4.1 Patogenicidade

Das nove linhagens de fungos entomopatogênicos, apenas quatro foram patogênicas à *B. salubricola* (Figura 1).

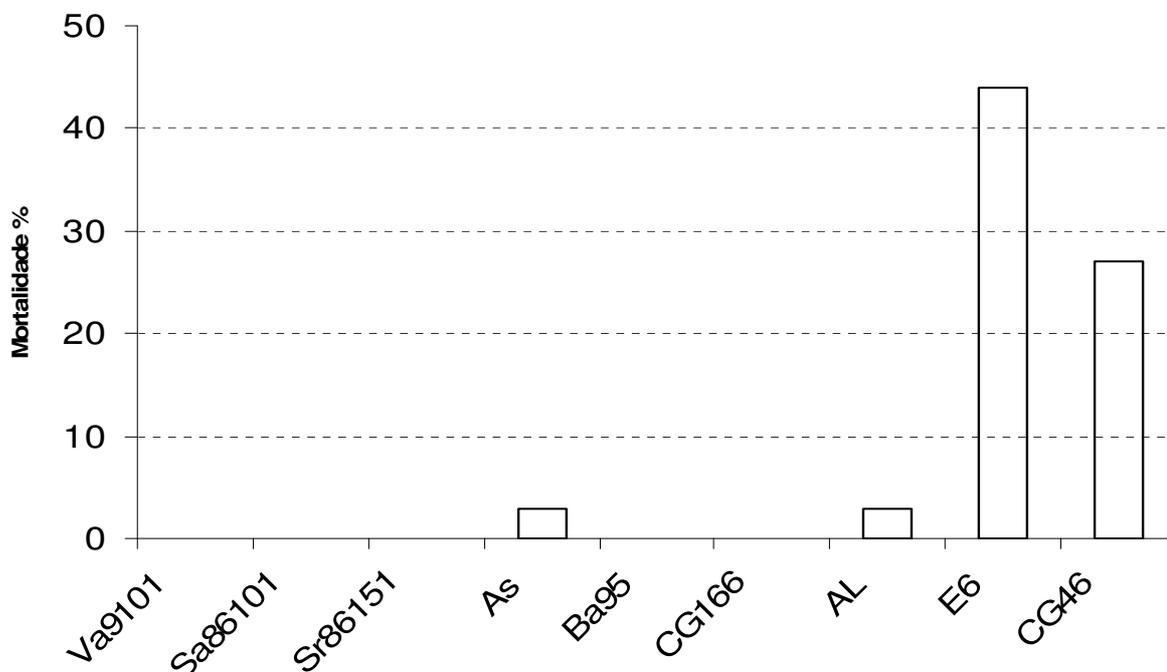


Fig. 1. Mortalidade percentual de lagartas de *B. salubricola* expostas a *Beauveria* sp. (AS) e a *M. anisopliae* (AL, CG46 e E6), na concentração de 2×10^7 con/mL, no segundo ínstar.

AS foi a única do gênero *Beauveria* que induziu mortalidade (10,00%), resultado interessante, pois a literatura relaciona diversos lepidópteros como hóspedes de *Beauveria* (ALVES, 1998), incluindo sua recomendação no controle de *Cydia pomonella* que, como *B. salubricola*, pertence a mesma família Tortricidae e apresenta plantas hospedeiras e hábitos similares (CARDÉ & MIKS, 1995; LACEY & UNRUH, 2005; HUMBER & HANSEN, 2005).

Todas as linhagens do gênero *Metarhizium* (AL 3,33%, CG46 26,66% e E6 43,33%) induziram mortalidade. Esse resultado de parasitismo tem uma possível relação com o amplo espectro de ação deste fungo, que já foi isolado de mais de 300 espécies de insetos, pertencentes a diferentes ordens, incluindo lepidópteros (ALVES, 1998), entre estes alguns

tortricídeos (HUMBER & HANSEN, 2005), sendo este um importante fato, pois fungos com maior espectro de ação, têm mais possibilidades de serem patogênicos a hospedeiros ainda não descritos como suscetíveis.

N. rileyi infecta comumente larvas de lepidópteros, com preferência por espécies de Noctuidae, causando epizootias em muitas populações de pragas que infestam sistemas agrícolas (SUWANNAKUT et al., 2005). Atribui-se a limitação da sua capacidade em parasitar tortricídeos como *B. salubricola* a essa especificidade. Entretanto, para confirmar essa hipótese devem ser realizados estudos de prospecção e isolamento de novas linhagens, especialmente em pomares de macieiras.

4.2. Virulência

A virulência diferencial dos fungos entomopatogênicos sobre *B. salubricola* variou entre linhagens e concentrações (Figura 2). As linhagens, AS de *Beauveria* sp.; AL, CG46 e E6 de *M. anisopliae* induziram mortalidade acumulada de 20, 54, 38 e 88% na maior concentração ($2,5 \times 10^9$ conídios/mL) respectivamente.

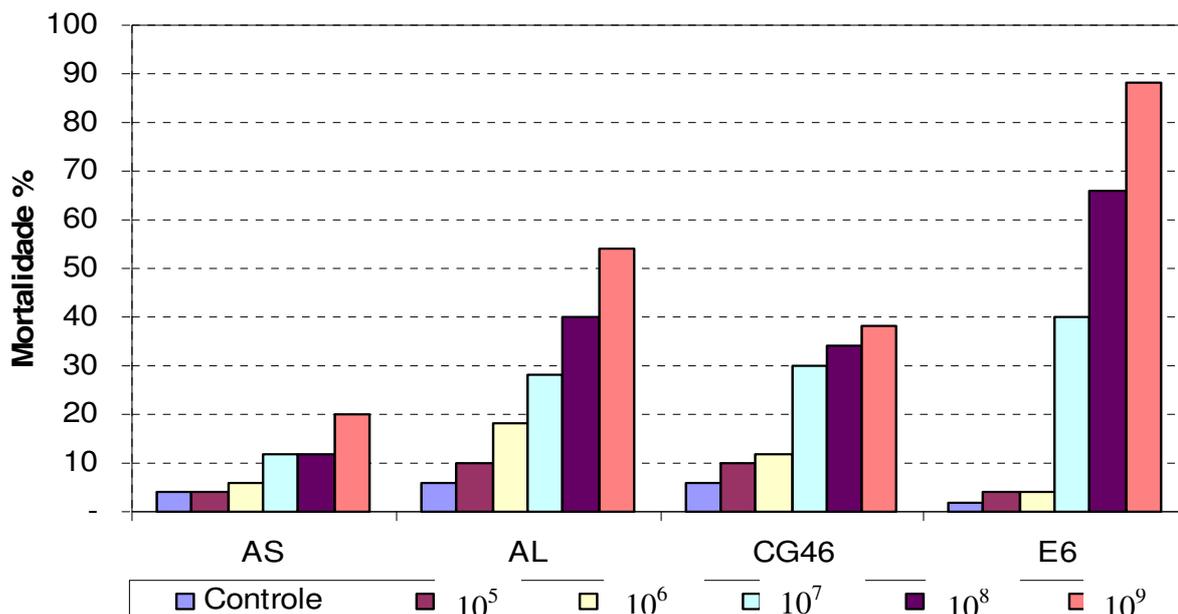


Fig. 2. Percentual de mortalidade acumulada de lagartas de *B. salubricola* tratadas com diferentes concentrações de *Beauveria sp.* (AS) e *M. anisopliae* (AL, CG46 e E6) no segundo ínstar.

Na maior concentração ($2,5 \times 10^9$ conídios/mL) a linhagem AS de *Beauveria sp.* (Figura. 3, Tab. 3), induziu a mortalidade máxima acumulada já no sexto dia após o início do bioensaio, sendo cinco vezes superior a observada no grupo controle (4%), porém, essa diferença não é significativa ($p < 0,05$); entretanto, constatou-se alta correlação entre dose administrada e mortalidade acumulada ($CP=0,845$).

Com relação a capacidade de fungos do gênero *Beauveria* em parasitar insetos cabe destacar que na literatura é citada parasitando o besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), a mosca Tsé-tsé, *Glossina morsitans morsitans*, o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*, entre outros, e em especial *Cydia pomonella* que, como *B. salubricola*, apresenta plantas hospedeiras e hábitos similares (CARDÉ & MIKS, 1995; LACEY & UNRUH, 2005; KAYA, 1989; KAYA & OKECH, 1990; KAYA & MUNYINYI, 1995; SILVA, 2001), cujo controle é realizado, principalmente, através de

formulações de *B. bassiana*, e em combinação com produtos químicos, objetivando a obtenção de efeito sinérgico (ALVES, 1998).

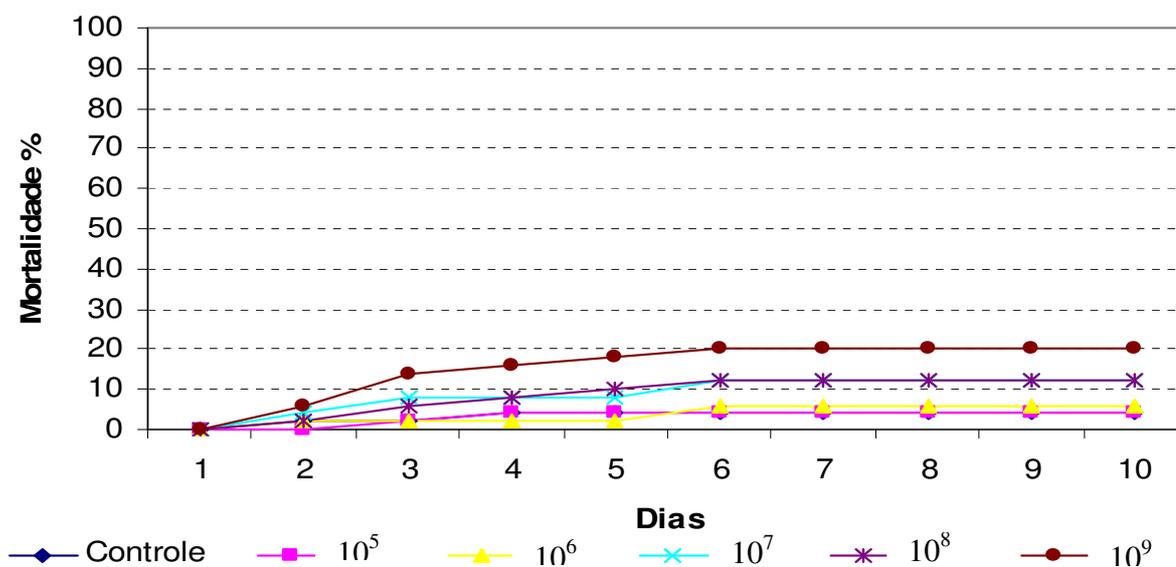


Fig. 3. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *B. salubricola* tratadas com diferentes concentrações do fungo *Beauveria* sp. (Linhagem AS).

Com relação a eficiência contra tortricídeos, *Beauveria* já foi descrito induzindo mais de 50% de mortalidade em *C. pomonella* (FERRON & VINCENT 1978), Garcia-Gutierrez et al. (2004), também relataram a eficiência de uma linhagem nativa de *Beauveria*, e de formulações comerciais (Mycotrol[®] e Meta-Sin[®]) sobre *C. pomonella*. Ferron (1978) e Falcão & Huber (1991) constataram que *Paecilomyces farinosus* e *B. bassiana*, são mais bem sucedidos quando combinados com pesticidas químicos, indicando a importância de estudos de compatibilidade objetivando um efeito sinérgico (MOHAMED et al., 1987; PACHAMUTHU & KAMBLE, 2000; FURLONG & GRODEN, 2001; ALMEIDA et al., 2003; SILVA et al., 2005).

Apesar dos baixos índices de mortalidade verificados no presente estudo, com vista a melhores resultados, considerando a grande variabilidade existente nestes entomopatógenos

(ALVES, 1998; GIUSTOLIN et al., 2001) devem ser realizados testes com novas linhagens e com inseticidas químicos compatíveis.

A linhagem AL de *M. anisopliae* induziu mortalidade acumulada na maior concentração, treze vezes superior ao controle (Figura 4, Tabela 3), verificando-se concentração letal mediana de $2,78 \times 10^8$ conídios/mL e tempo letal mediano de 8,42 dias. Observou-se também correlação positiva entre mortalidade e concentração (CP=0,794). Os índices de mortalidade acumulada foram superiores aos obtidos com as linhagens AS e CG46, mas inferiores a E6 (Tab. 3), o que permite sugerir esta linhagem como possível alternativa de controle biológico de *B. salubricola*.

Em estudo realizado por Loureiro & Monteiro (2004), a linhagem AL (*M. anisopliae*) induziu mortalidade de 50% na concentração de 1×10^9 conídios/mL, em operarias de *Atta sexdens*, índice similar ao observado (54%) para *B. salubricola*, na maior concentração ($2,5 \times 10^9$). O tempo letal foi 2,74 dias, inferior ao observado neste estudo (8,42 dias), demonstrando que a letalidade do fungo pode ser diferente em função do hospedeiro avaliado, referenciando a importância da avaliação em particular de cada relação de controle biológico.

A linhagem CG46 (Figura 5, Tabela 3), induziu os menores índices de mortalidade observados para o gênero *Metarhizium* (38%), mesmo assim, na maior concentração testada observou-se mortalidade cerca de seis vezes superior a do grupo controle, verificando-se uma correlação apenas numérica, porém positiva (CP=0,634).

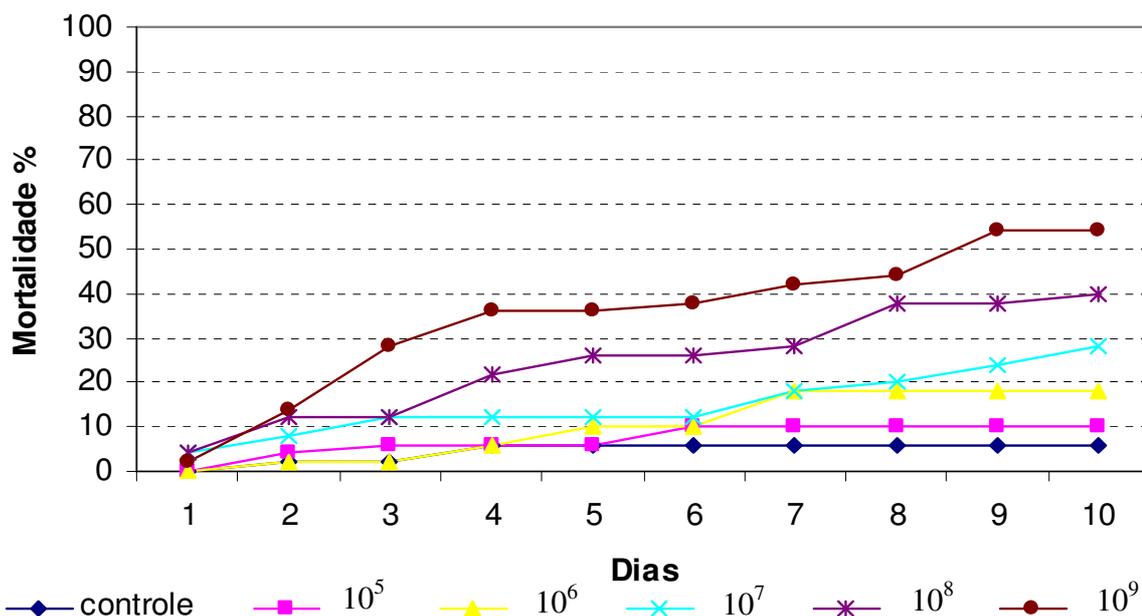


Fig. 4. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *B. salubricola* tratadas com o fungo *M. anisopliae* (Linhagem AL).

Em relação a virulência observou-se variabilidade entre as linhagens de *Metarhizium*, sendo que CG46 induziu em sua maior concentração mortalidade de *B. salubricola* de 38%, inferior a AL (54%), e a E6 (88%), resultado similar também foi observado por ROHDE et al. (2006) verificando desde 8,3 até 90% de mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE), essa variabilidade demonstra a importância da prospecção de novas linhagens com maior potencial de controle, as quais podem ser utilizadas em programas de Manejo Integrado de Pragas (GIUSTOLIN et al., 2001; ALVES, 1998; SOSA-GOMEZ, 2005; GUTIÉRREZ et al., 2004; ERICSSON et al., 2007).

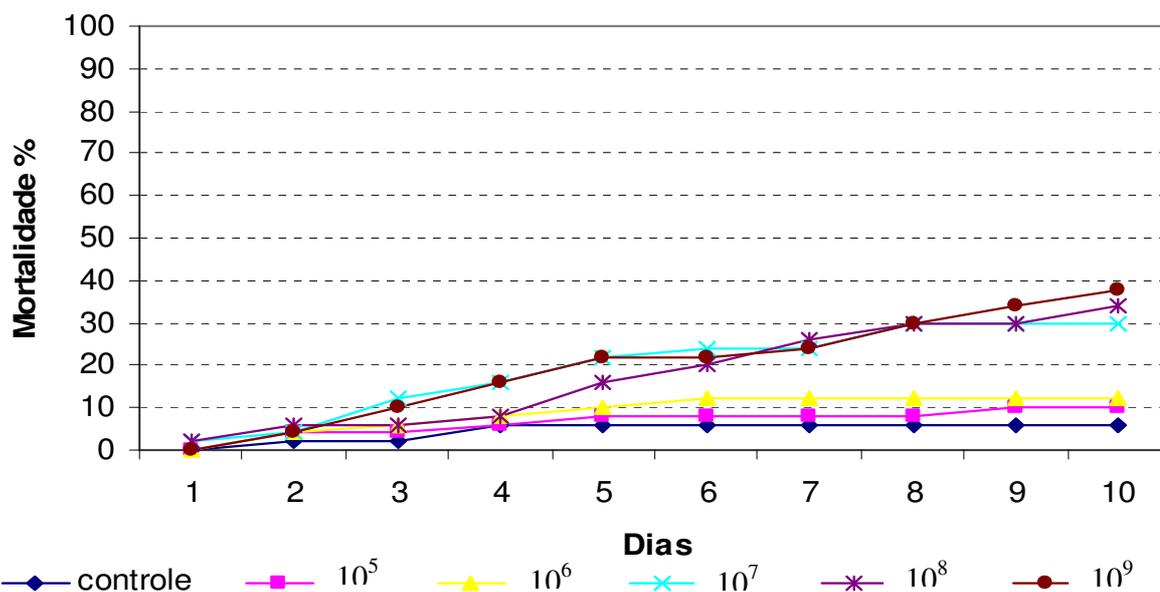


Fig. 5. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *B. salubricola* tratadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* (Linhagem CG46).

A linhagem que induziu os maiores índices de mortalidade de *B. salubricola* foi a E6 (*M. anisopliae*) (Figura 6, Tabela 3), observando-se mortalidade larval acumulada de 88% na maior concentração, índice cerca de 44 vezes superior a mortalidade do grupo controle, e uma correlação positiva entre mortalidade e tratamentos (CP=0,774). A concentração letal mediana (CL₅₀) foi de $2,68 \times 10^7$ conídios/mL e o tempo letal mediano (TL₅₀) de 1,66 dias, período relativamente curto, sendo que em menos de 40 horas provocou a morte de metade da população de *B. salubricola* se comparado a linhagem AL que induziu este mesmo índice 200 horas após o início do bioensaio.

O TL₅₀ observado para E6 também foi similar ao observado por Silva (2003) com *M. anisopliae* parasitando *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) variando de 16,8 até 33,6 horas, tempos relativamente curtos, pois de acordo com ALVES (1998) os fungos entomopatogênicos, em média, provocam a morte de seus hospedeiros no intervalo de 48 a 144 horas, sendo o tempo letal um indicativo complementar da virulência de cada isolado (SILVA, 2003).

Os resultados obtidos com a linhagem E6 (*M. anisopliae*) (Figura. 6) permitem inferir seu uso potencial para o controle da lagarta-enroladeira-da-macieira, sendo dentre os fungos testados o que induziu os maiores índices de mortalidade com menor período de tempo.

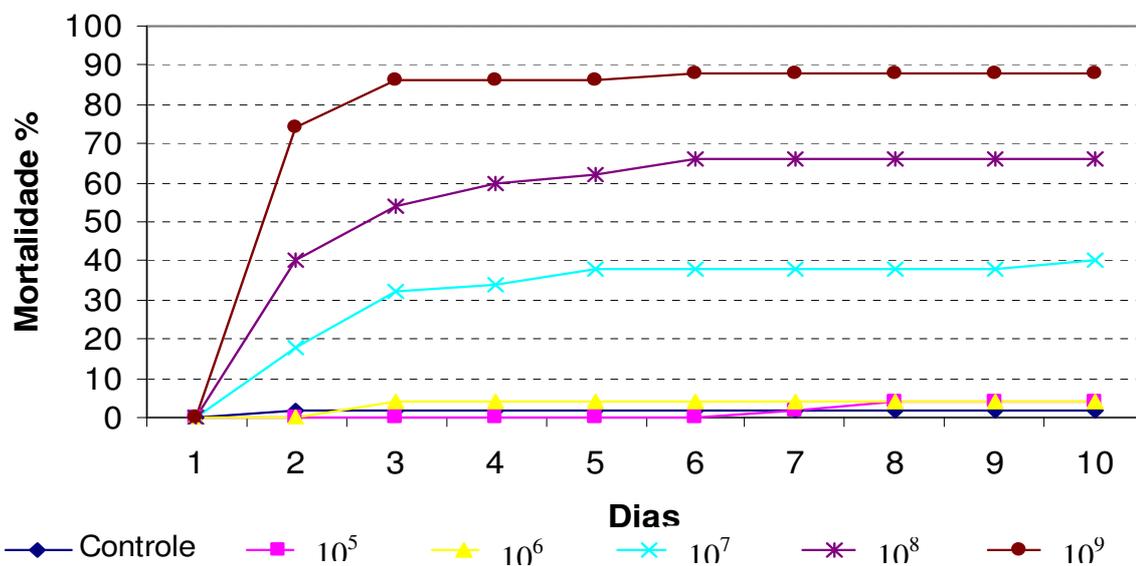


Fig. 6. Percentual de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *B. salubricola* tratadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* (Linhagem E6).

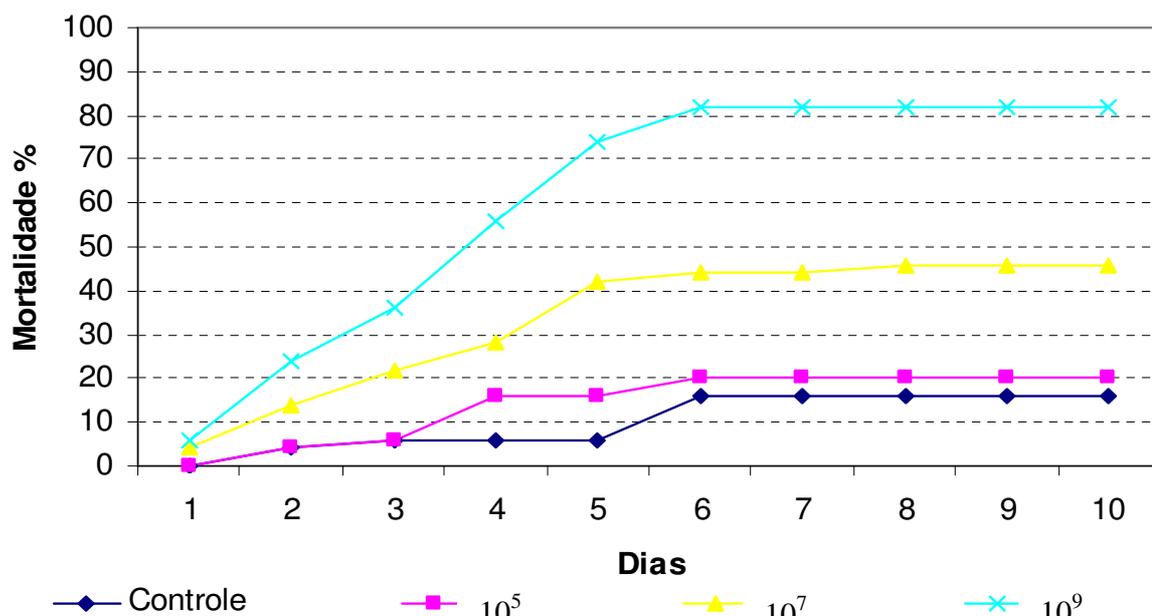


Fig. 7. Percentual de mortalidade de lagartas de primeiro ínstar de *B. salubricola* tratadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* (Linhagem E6).

A virulência nos bioensaios conduzidos com lagartas de primeiro ínstar (Figura 7), evidenciou uma relação positiva entre o aumento da concentração de esporos da linhagem E6 de *M. anisopliae* e a mortalidade de *B. salubricola*. Na maior concentração a mortalidade (82%) foi aproximadamente cinco vezes superior a do grupo controle. A elevada mortalidade observada no grupo controle (16%) possivelmente decorreu do tamanho reduzido das lagartas, o que dificultou a manipulação durante o bioensaio.

Nos ensaios com lagartas de quarto ínstar (Figura. 8), a linhagem E6 (*M. anisopliae*) na concentração de $2,5 \times 10^7$ con/mL induziu 4% de mortalidade, não diferindo estatisticamente dos grupos controle e $2,5 \times 10^5$ con/mL. Na maior concentração ($2,5 \times 10^9$ con/mL) a mortalidade acumulada foi de 48%, índice menor se comparado a lagartas de primeiro (82%) e segundo ínstar (88%), mas semelhante ao observado por Giustolin et al., (2001) em que *Tuta absoluta* foi mais sensível a *B. bassiana* no primeiro e segundo ínstars em relação ao quarto.

Atribui-se a maior mortalidade no primeiro e segundo ínstars, em relação ao quarto, em parte, com a hidrofobicidade da cutícula, que nos primeiros favorece a aderência dos esporos, conseqüentemente aumentando a suscetibilidade do hospedeiro aos propágulos fúngicos (BOUCIAS et al., 1988).

De acordo com o estágio de desenvolvimento de *B. salubricola*, o controle biológico pode tornar-se tão ou mais eficiente que o controle químico, pois a mortalidade induzida pela linhagem E6 (82%) em larvas de primeiro ínstar (Figura 7), aproximou-se dos 100% provocados pelos inseticidas químicos clorpirifós-etil, metidation, fosmet, triclorfom, tebufenozide, fenitrothion e carbaril (Botton et al., 2000b). No quarto ínstar, a percentagem de mortalidade de 48% (Figura 8), foi superior a observada por Botton et al. (2000) com Fosmet

(27,7%); Fenitrothion (22,2%) e Metidation (28,9%) e inferior a Triclorfom (80,6%); Clorpirifós (88,9%); Tebufenozide (83,3%) e Carbaril (55,6%).

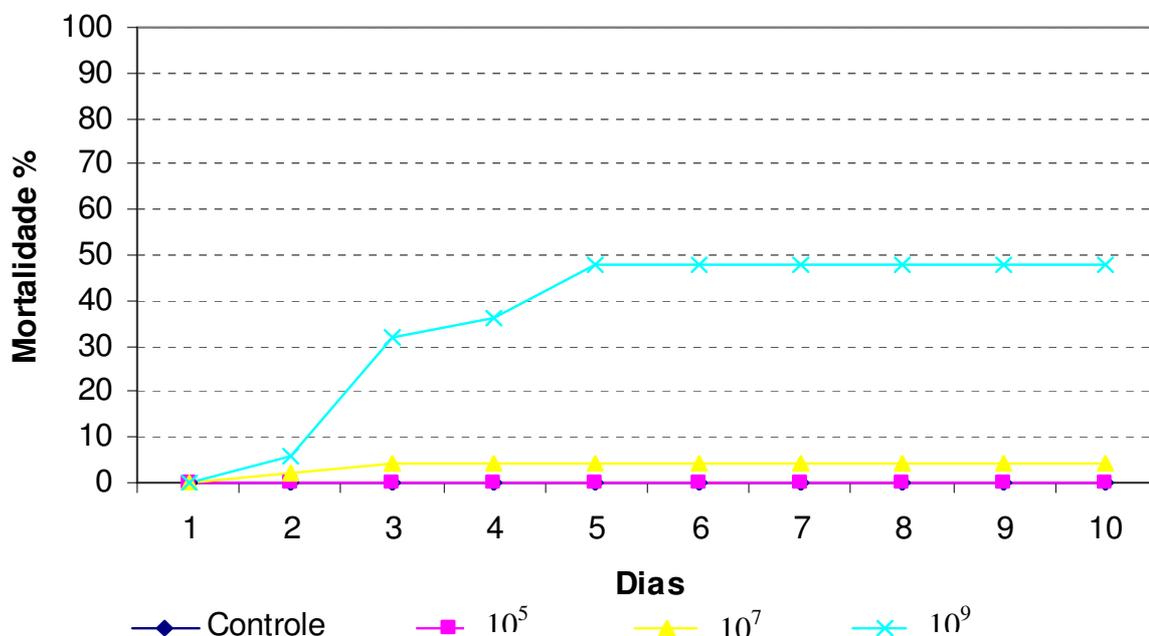


Fig. 8. Percentual de mortalidade de lagartas de quarto ínstar de *B. salubricola* tratadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* (Linagem E6).

Com relação a importância da preservação dos inimigos naturais de *B. salubricola* cabe destacar que a perspectiva de um entomopatógeno para o controle de *B. salubricola*, traz ainda a possibilidade de manutenção dos inimigos naturais, predadores e parasitóides, principalmente os microhimenópteros parasitóides de ovos (*Trichogrammatidae*) e de larvas (*Braconidae* e *Icheumonidae*) (BOTTON et al., 2002; MONTEIRO et al., 2004; BORBA et al., 2006; PASTORI et al., 2007).

Os *Braconídeos* (*Apanteles sp.* e *Earinus sp.*) e *Icheumonídeos* (*Itopectis brasiliensis*), mantém em condições naturais, parasitismo médio de 1,7% (BOTTON et al., 2002). Segundo Monteiro et al., (2004) o parasitóide de ovos, *Trichogramma pretiosum* parasita cerca de 6,6% das posturas, e destas 22,3% dos ovos em bioensaios a campo. Contrapondo estes dados, Borba et al., (2006) observou que *T. bruni* parasitou 47% e duas

linhagens de *T. pretiosum* parasitaram 45,3 e 52,3% dos ovos, e mais atualmente em outro estudo em condições de laboratório, *T. pretiosum* chegou a parasitar 80% dos ovos (PASTORI et al., 2007).

Tabela 3. Mortalidade média acumulada de 50 lagartas de *B. salubricola* em ensaios com diferentes concentrações de fungos no segundo ínstar.

Linhagens	Concentração	Mortalidade Larval			CL50 (conídios/mL)	TL50 (dias)
		1º Dia	5º Dia	10º Dia		
AS <i>B. bassiana</i>	Testemunha	0 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a		
	10 ⁵	0 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a		
	10 ⁶	0 ^a	0,2 ^a	0,6 ^a		
	10 ⁷	0 ^a	0,8 ^a	1,4 ^a		
	10 ⁸	0 ^a	1,0 ^a	1,4 ^a		
	10 ⁹	0 ^a	1,8 ^a	2,2 ^a		
AL <i>M. anisopliae</i>	Testemunha	0 ^a	0,4 ^a	0,6 ^a		
	10 ⁵	0 ^a	0,6 ^a	1,0 ^a		
	10 ⁶	0 ^a	1,0 ^{a,b}	1,8 ^{a,b}	2,78 x 10 ⁸	8,42
	10 ⁷	0,4 ^a	1,2 ^{a,b}	2,8 ^{a,b,c}	(+0,47x10 ⁸ -0,22x10 ⁸)	(+2,4 -1,37)
	10 ⁸	0,4 ^a	2,6 ^{a,b}	4,0 ^{b,c}		
	10 ⁹	0,2 ^a	3,6 ^b	5,4 ^c		
CG46 <i>M. anisopliae</i>	Testemunha	0 ^a	0,6 ^a	0,6 ^a		
	10 ⁵	0 ^a	0,8 ^a	1,0 ^{a,b}		
	10 ⁶	0 ^a	1,0 ^a	1,2 ^{a,b,c}		
	10 ⁷	0,2 ^a	2,2 ^a	3,0 ^{a,b,c}		
	10 ⁸	0,2 ^a	1,6 ^a	3,4 ^{b,c}		
	10 ⁹	0 ^a	2,2 ^a	3,8 ^c		
E6 <i>M. anisopliae</i>	Testemunha	0 ^a	0,2 ^a	0,2 ^a		
	10 ⁵	0 ^a	0,0 ^a	0,4 ^a	2,68 x 10 ⁶	1,66
	10 ⁶	0 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	(± 0,1 x 10 ⁷)	(+0,19 -0,16)
	10 ⁷	0 ^a	3,8 ^b	4,0 ^b		
	10 ⁸	0 ^a	6,2 ^b	6,6 ^{b,c}		
	10 ⁹	0 ^a	8,8 ^c	8,8 ^c		

*Médias seguidas por letras diferentes indicam significância do percentual de mortalidade para concentração de cada linhagem (coluna), e tempo (linha), com p<0,05.

O presente estudo evidencia o potencial dos fungos entomopatogênicos no controle de *B. salubricola*, que podem ser avaliados conjuntamente com outros agentes como

parasitóides visando diminuir o uso de inseticidas químicos, amplamente utilizados em pomares convencionais, que além de reduzirem as populações de inimigos naturais, possibilitam a ressurgência e a resistência da praga alvo (BOTTON et al., 2000b; BOTTON et al., 2002; KOVALESKI et al., 1998). Isso evitaria as diversas pulverizações anuais de produtos químicos para controle de *B. salubricola*, nos pomares convencionais (KOVALESKI et al., 1998).

Diante do potencial da utilização de fungos entomopatogênicos especialmente *M. anisopliae* no controle de *B. salubricola*, ampliam-se as perspectivas sobre a utilização de novos agentes microbianos. Para tanto, fazem-se necessários estudos de prospecção, caracterização biológica e molecular, para selecionar os isolados com maior eficiência e viabilidade como bioproduto. É provável que tais agentes ocorram naturalmente nos pomares e estejam sendo suprimidos pelo manejo convencional, que ainda é adotado pela maioria dos pomicultores. Estudos de prospecção, caracterização e produção destes fungos podem viabilizar o controle da lagarta-enroladeira-da-macieira de forma econômica e mais segura para o homem e o ambiente, conforme demonstrado para outras pragas e culturas na América Latina (ALVES & LOPES, 2008), como preconizam os programas de manejo integrado (KOVALESKI & RIBEIRO, 2003).

4.3 Efeitos dos entomopatógenos sobre a mortalidade larval e pupal de *B. salubricola*

Além da mortalidade larval verificou-se que os tratamentos com diferentes concentrações e linhagens interferiram na mortalidade pupal (Figura 9).

A linhagem AS de *Beauveria* sp. na concentração de $2,5 \times 10^5$ con/mL, não influenciou a mortalidade larval, entretanto a mortalidade pupal foi 11% maior que a do

controle (87%) (Figura 9). Desta forma apesar do fungo induzir mortalidade larval reduzida, afetou as fases subseqüentes, diminuiu a sobrevivência pupal e conseqüentemente o número de adultos. Resultado semelhante foi observado na concentração de $2,5 \times 10^8$, onde observou-se 88% de sobrevivência larval, porém, apenas, 66% de sobrevivência pupal. Nos demais tratamentos também observou-se maior mortalidade pupal em relação ao controle.

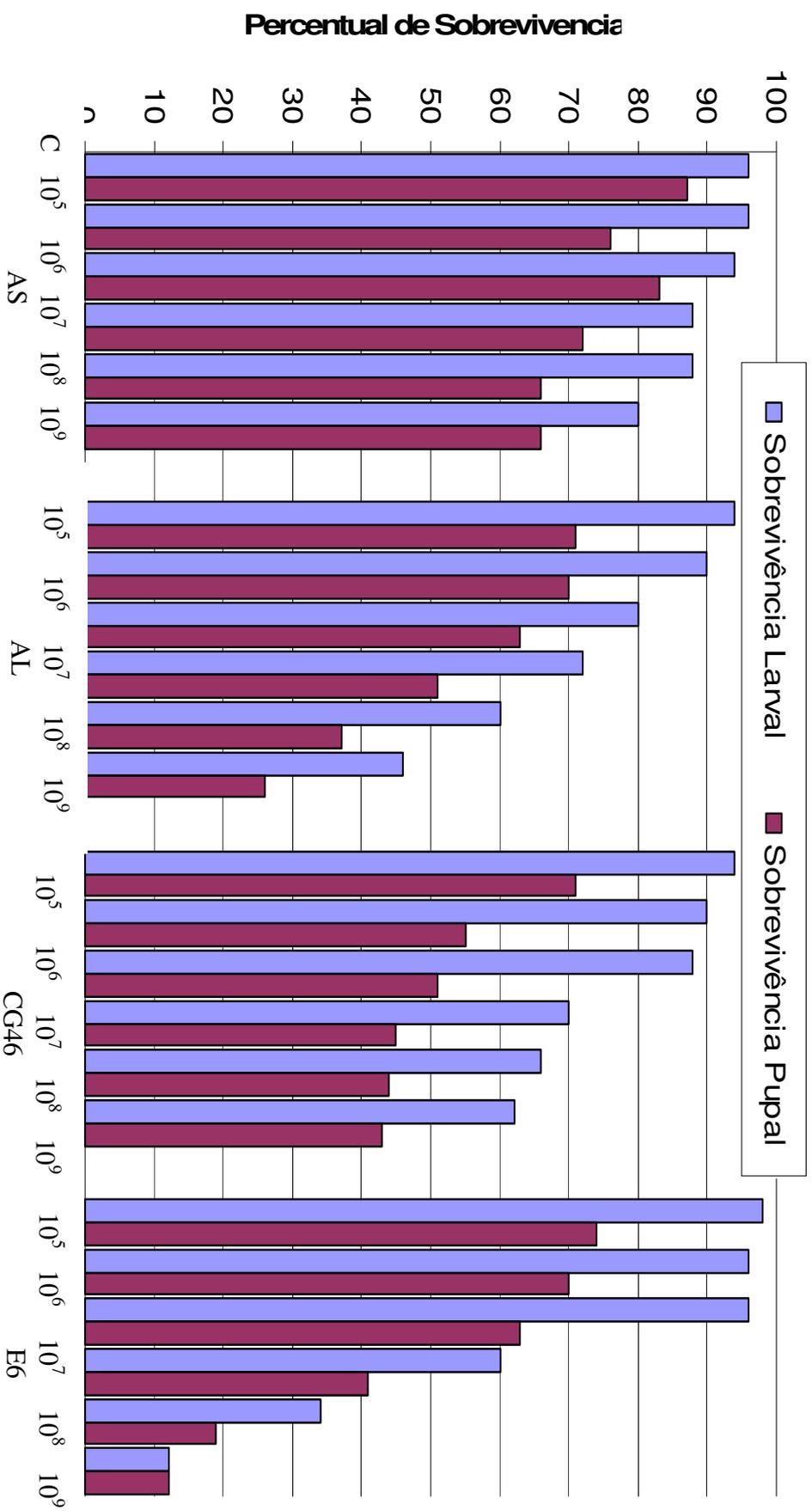


Fig. 9. Percentual de sobrevivência larval e pupal de *B. salubricola* de acordo com as linhagens AS (*Beauveria* sp.), AL, CG46 e E6 (*M. anisopliae*) com os diferentes tratamentos.

A linhagem AL de *M. anisopliae* (Figura 9) não influenciou significativamente na sobrevivência pupal, não verificando-se diferenças significativas no número mariposas e pupas em relação ao grupo controle.

Nos ensaios com a linhagem CG46 de *M. anisopliae* (Figura 9), observou-se variações na sobrevivência pupal do grupo controle e dos tratamentos $2,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^6$ con/mL, verificando-se a formação de 94, 90 e 88,00% de pupas e 71, 55 e 51,00% de mariposas, respectivamente. Dessa forma, a mortalidade pupal foi 12 e 14% maior respectivamente nos grupos teste em relação ao controle.

Os testes com a linhagem E6 de *M. anisopliae* (Figura 2 e 9), induziram mortalidade larval de 88% na maior concentração, entretanto não houve mortalidade pupal, diferindo de todas as outras linhagens e tratamentos. Dessa forma, as lagartas infectadas nessa dosagem morreram ainda na fase de larva. Na concentração de $2,5 \times 10^6$ con/mL foi observada uma mortalidade larval muito próxima ao controle (Tab. 3), porém 33% das pupas morreram, cerca de 11% a mais, em relação ao grupo controle. Assim, nessa dosagem a mortalidade larval foi similar ao grupo controle, mas a mortalidade pupal foi significativamente maior.

Existem poucos relatos sobre avaliação da sobrevivência pupal em bioensaios. Entre estes, pode-se citar estudos sobre o predador *Calosoma granulatum* que ataca tanto lagartas quanto pré-pupas e pupas de lepidópteros praga de diversas culturas (CHOCOROSQUI & PASINI, 2000), e com parasitóides Himenópteros (BITTENCOURTI & BERTI-FILHO, 2004). O fungo *B. bassiana* também já foi relatado parasitando em condições naturais pupas de *diaperinus*, em aviários (ALVES et al., 2005).

Estes resultados contribuem para um novo delineamento na observação de índices de mortalidade, principalmente em dosagens menores, muitas vezes ditas como sub-letais, onde o efeito total real da mortalidade deve ser observado acompanhando todo ciclo de vida do

hospedeiro. Assim, a mortalidade serve como parâmetro de virulência, mas pode estar subestimando resultados reais de sobrevivência.

4.4 Atividade Proteolítica

Os fungos entomopatogênicos apresentam fatores de virulência, dentre os quais destacam-se a produção de enzimas, sendo as proteases citadas por muitos trabalhos por estarem envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares, facilitando a penetração das hifas através da cutícula do inseto (ST. LEGER et al., 1986; TIAGO & FURLANETO, 2003; GUPTA et al., 1994), sendo estudadas com varias finalidades, como a de correlacioná-las com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência.

As análises da atividade enzimática em MMI (Meio mínimo) ficaram muito próximas de zero para as linhagens testadas (Tabela 4), resultado que confirma a necessidade de fontes indutoras (carbono/nitrogênio) no meio de cultivo, para os fungos expressarem suas enzimas, tendo em vista que nos meios MMI+CAS (Meio mínimo acrescido de caseína) induziram e possibilitaram a detecção de atividade enzimática nos sobrenadantes de cultivo (Figura. 10 e 11).

As linhagens de *B. bassiana* (Figura 10, Tabela 4) apresentaram índices crescentes de atividade enzimática em relação ao tempo de cultivo, de modo que os maiores índices foram observados 72h após a incubação. A linhagem AS (*Beauveria*) foi a única entre as linhagens deste gênero que induziu mortalidade de *B. salubricola* e também a que expressou os maiores índices de Pr1 (U 13,83).

As linhagens do gênero *Metarhizium* (Figura 11 e Tabela 4) apresentaram índices crescentes de atividade enzimática em relação ao tempo de cultivo, porém as linhagem AL e CG46 expressaram índices enzimáticos quase estáveis até 48h de cultivo, e um aumento de aproximadamente 36 vezes na atividade enzimática de 48 para 72horas

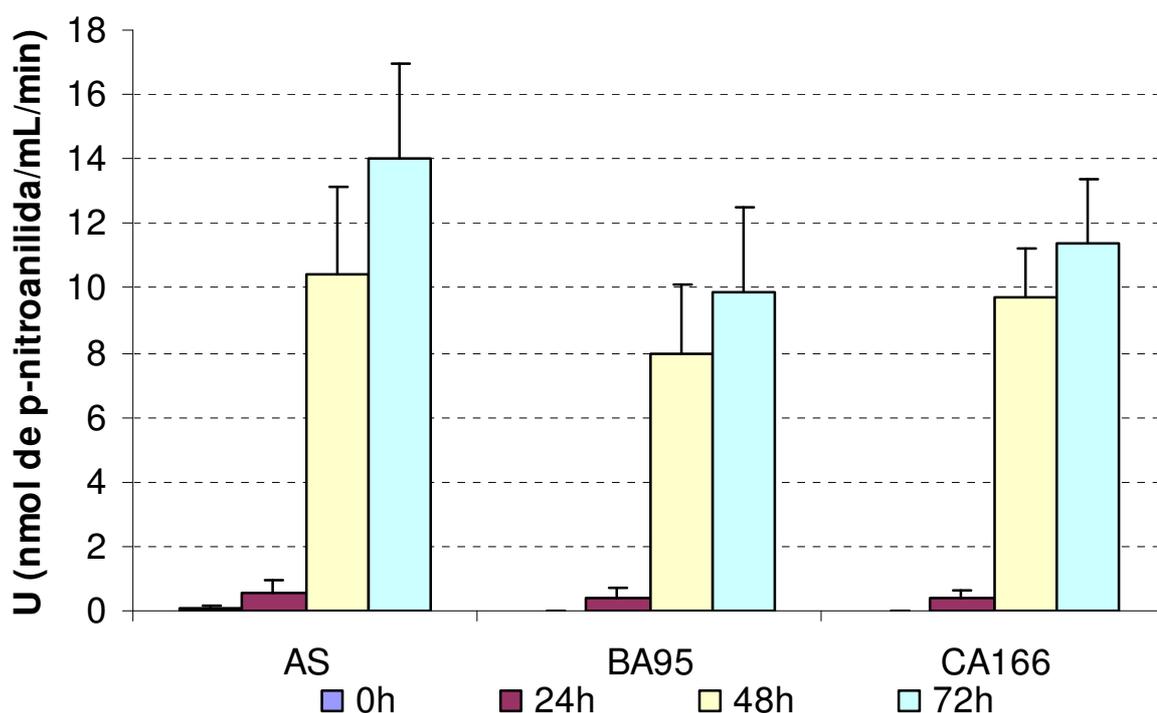


Fig. 10. Atividade de protease tipo-subtilisina (Pr1), das linhagens (AS, BA95 e CG166) de *Beauveria* a cada 24h.

A linhagem E6, para qual se observou o maior índice de atividade enzimática (U 14,82), e também a maior porcentagem de mortalidade larval de *B. salubricola* (88%), tempo letal mediano (TL₅₀) reduzido (1,66 dias), apresenta uma possível associação destes resultados com a alta produção enzimática, que facilitaria a penetração do fungo na cutícula do inseto. Estes resultados são corroborados pelos observados por GUPTA et al. (1994) que demonstraram a existência de correlação entre os níveis de quitinases e proteases tipo-Pr1

produzidas por diferentes linhagens fungicas e sua virulência, relatando que altos níveis desta enzima parecem estar relacionados com um menor tempo de mortalidade.

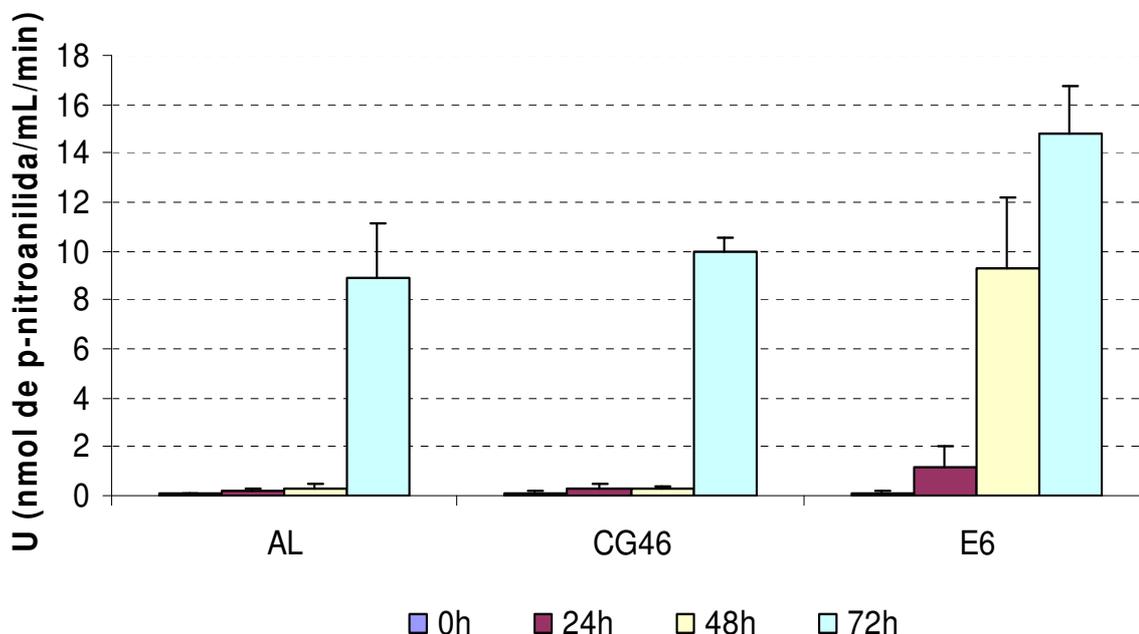


Fig. 11. Atividade de protease tipo-subtilisina (Pr1), das linhagens (CG46 e E6) de *M. anisopliae* e da (AL) de *M. flavoviride* a cada 24h.

Tabela 4. Avaliação da atividade proteolítica de *Beauveria* e *Metarhizium* do tipo-subtilisina (Pr1) em MMI e MMI+CAS.

Linhagens	Meios	Tempos				
		0h	24h	48h	72h	
AL	MMI	0,003 ± 0,005 ^a	0,060 ± 0,050 ^a	0,150 ± 0,145 ^a	0,076 ± 0,070 ^a	
	MMI + Cas	0,066 ± 0,058 ^a	0,166 ± 0,144 ^a	0,263 ± 0,196 ^a	8,870 ± 2,255 ^b	
Met arh	CG46	MMI	0,014 ± 0,025 ^a	0,037 ± 0,034 ^a	0,077 ± 0,080 ^a	0,009 ± 0,009 ^a
	MMI + Cas	0,104 ± 0,125 ^a	0,268 ± 0,252 ^a	0,277 ± 0,145 ^a	9,920 ± 0,585 ^b	
iziu m	E6	MMI	0,000 ± 0,000 ^a	0,054 ± 0,078 ^a	0,062 ± 0,092 ^a	0,062 ± 0,092 ^a
	MMI + Cas	0,112 ± 0,097 ^a	1,189 ± 0,866 ^a	9,286 ± 2,926 ^b	14,82 ± 1,925 ^c	
AS	MMI	0,000 ± 0,000 ^a	0,010 ± 0,020 ^a	0,000 ± 0,000 ^a	0,044 ± 0,064 ^a	
	MMI + Cas	0,054 ± 0,102 ^a	0,540 ± 0,415 ^b	10,40 ± 2,717 ^b	14,01 ± 2,917 ^{c,b}	
Bea uve ria	BA 95	MMI	0,001 ± 0,002 ^a	0,002 ± 0,005 ^a	0,011 ± 0,019 ^a	0,266 ± 0,178 ^a
	MMI + Cas	0,002 ± 0,005 ^a	0,395 ± 0,304 ^{a,b}	7,932 ± 2,210 ^b	9,905 ± 2,589 ^b	
CG 166	MMI	0,013 ± 0,023 ^a	0,019 ± 0,020 ^a	0,243 ± 0,189 ^a	0,213 ± 0,283 ^a	
MMI + Cas	0,003 ± 0,005 ^a	0,436 ± 0,177 ^b	9,726 ± 1,509 ^b	11,35 ± 2,055 ^c		

*Os valores estão expressos em U (nmol de p-nitroanilida.mL⁻¹.min⁻¹).

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em cada tempo avaliado, de acordo com cada gênero com p<0,05.

Observou-se índices de atividade enzimática do tipo-tripsina (Pr2) em apenas duas linhagens (Figura. 13), uma do gênero *Metarhizium*, E6 (U 0,144), identificando Pr2 como um dos possíveis indicadores de virulência em fungos entomopatogênicos, porém não o único, pois a outra linhagem, CG166 de *B. bassiana*, com índice superior de Pr2 (U 0,268), não foi patogênica à *B. salubricola* (Figura. 12). A ação conjunta de indutores como cutícula de inseto e pH, podem fornecer o mecanismo de sinais que provocam a secreção enzimática (ST.LEGER, et al., 1998). No presente trabalho os valores de Pr2 podem ter sido influenciados pelo pH, ajustado previamente em 6,8, sem controle após inoculação do fungo. Segundo GUPTA et al., (1993) o pH ideal em sobrenadantes de cultivo para produção de Pr2 é de 8,5 para *N. rileyi*, porém Nunes (2005) detectou atividade do tipo Pr2 para este mesmo fungo em pH 7,0.

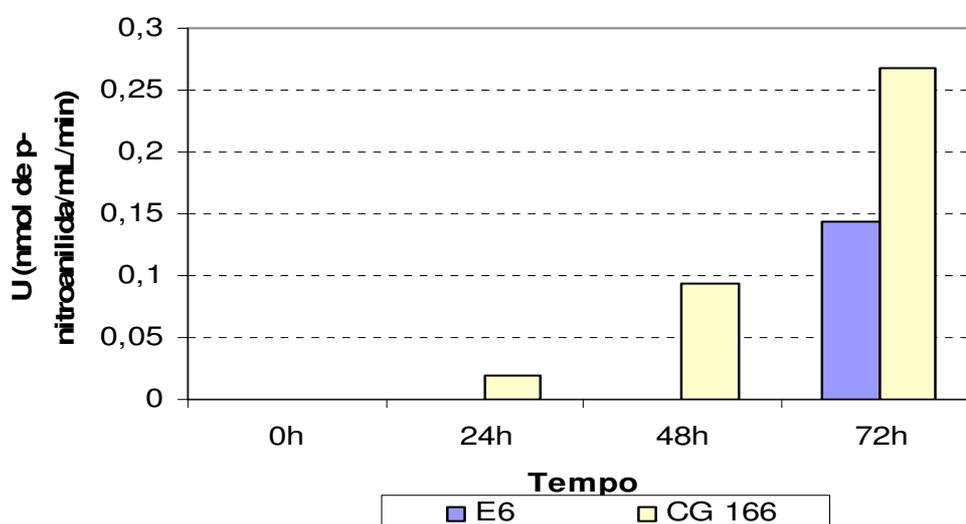


Fig. 12. Atividade de protease tipo-tripsina (Pr2), da linhagem E6 de *M. anisopliae* e da linhagem CG166 de *B. bassiana* a cada 24h.

A atividade enzimática dos sobrenadantes em MMI foi similar para ambas as linhagens testadas, tanto para Pr1 tipo-subtilisina, quanto para Pr2 tipo-tripsina, sendo que

seus índices ficaram muito próximos de zero, o que está de acordo com MORAIS et al. (2003) e CAMPOS et al. (2005), que sugerem que a atividade de Pr1 e Pr2, assim como de quitinases dependem dos níveis de fontes de carbono e nitrogênio e da presença de proteínas indutoras no meio de cultivo.

Segundo Nunes (2005) o maior valor de Pr1 observado para *N. rileyi* foi de 5,21 U após 216 horas de cultivo, resultado bem abaixo dos observados no presente trabalho, observando-se para a linhagem E6 14,8 U em 72 horas de cultivo. Esse resultado pode servir de indicativo, sendo a lenta e baixa produção de protease do tipo-Pr1 fatores provavelmente limitantes da patogenicidade de *N. rileyi*.

A atividade do tipo-subtilisina (Pr1) possibilitou indicar uma relação com a capacidade do fungo em penetrar no inseto e causar a doença, sendo que de acordo com os resultados obtidos essa capacidade de causar a doença seguida de morte aumenta de acordo com a atividade enzimática. Observa-se que para ambos os gêneros, que os microrganismos mais virulentos foram também os com maiores índices de atividade enzimática do tipo-subtilisina Pr1.

Considerando-se as linhagens GC46 (*M. anisopliae*) (Figura 5) e AL (*M. anisopliae*) (Figura 4) observou-se que a mortalidade larval de *B. salubricola* estabilizou-se somente no décimo dia, entretanto, ALVES (1998), relata que em média os fungos levam o inseto a morte no intervalo de 2 a 8 dias, fato ocorrido com AS (*Beauveria* sp.) (Figura 3) e E6 (*M. anisopliae*) (Figura 6) onde a mortalidade larval estabilizou-se do quinto para sexto dia, nota-se que para AS e E6 foram observados os maiores índices de atividade enzimática do tipo-Pr1, a qual possivelmente estaria associada a rápida indução de morte pelos fungos, e não ao número de larvas mortas.

Os índices de atividade enzimática, apesar de terem uma clara relação com a patogenicidade e virulência dos fungos entomopatogênicos não podem servir como únicos parâmetros na busca de microrganismos patogênicos, sendo que a linhagem CG166 de *B. bassiana* com Pr1 de (U 9,72) não foi patogênica, e a linhagem AL de *M. anisopliae* com Pr1 de (U 7,99) induziu mortalidade larval de 54%. Essa diferença sugere que outros fatores além da atividade enzimática do tipo-subtilisina (Pr1) estão relacionados com a capacidade destes microrganismos causarem a doença neste lepidóptero, porém observou-se que existe uma relação positiva entre o tempo e a atividade enzimática, de modo que quanto maiores os índices de atividade enzimática observados menores foram os tempos necessários para induzir mortalidade em cada gênero testado.

4.5 Compatibilidade Entre Fungos e Inseticidas

O controle biológico com fungos entomopatogênicos é uma real alternativa, que por vezes, pode ser compatível com o controle químico, e tem como objetivos, o efeito sinérgico, a alternância entre métodos de controle, ou identificar inseticidas compatíveis com os fungos, para garantir sua permanência no ambiente tratado visando a diminuição dos agroquímicos (ALVES, 1998; BATISTA FILHO et al. 2001; SOSA-GOMEZ, 2005; SILVA, et al., 2005).

A linhagem E6 (*M. anisopliae*) foi compatível com tebufenozide, onde não observaram-se diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no crescimento vegetativo e esporulação (Figura 13, Tabela 5), em relação ao controle. Já Methidathion, Fenitrotiom e Clorpirifós influenciaram negativamente no crescimento vegetativo e esporulação (Figura 13, Tabela 5), sendo ambos considerados como muito tóxicos de acordo com o teste T (Tabela 5). O

inseticida Methidathion foi responsável pela maior redução no crescimento vegetativo, sendo 85,66% menor em relação ao grupo controle.

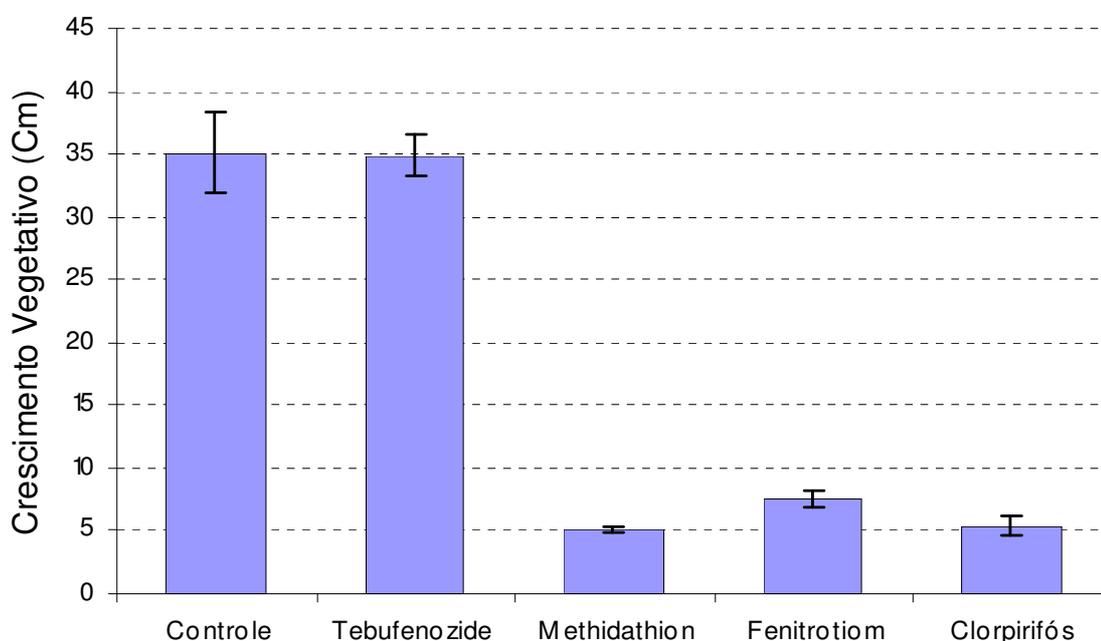


Figura 13. Crescimento vegetativo da linhagem E6 (*M. anisopliae*), associada com inseticidas após 10 dias de incubação.

Tabela 5. Teste de compatibilidade entre a linhagem E6 (*M. anisopliae*) e os respectivos tratamentos após 10 dias de incubação.

Tratamentos	Media	Nº de Esporos	Valor T	Classificação
Controle	35,08 ± 3,19 a	4,068x10 ⁶	##	##
Tebufenozide	34,88 ± 1,59 a	4,492x10 ⁶	108,22	Compatível
Methidathion	5,03 ± 0,2 b	6,2x10 ⁴	4,08	Muito Tóxico
Fenitrotiom	7,48 ± 0,66 b	4,2x10 ⁴	5,09	Muito Tóxico
Clorpirifós	5,33 ± 0,78 b	1,5x10 ⁴	3,41	Muito Tóxico

* Médias seguidas de mesma letra não se diferenciam estatisticamente (p<0,05)

- Muito tóxico - entre 0 e 30% e Compatível - acima de 61% (ALVES *et al.*, 1998).

São rotineiramente utilizados nos pomares de maçãs, azinfós-etílico, carbaryl, clorpirifós, deltamethion, tebufenozide, trichorfon (RIBEIRO, 1999) diflubenzuron, fenitrotiom e methidation (Gallo *et al.*, 2002), além disso, são efetuadas aplicações de outros agrotóxicos, principalmente fungicidas e herbicidas. O uso abusivo de agrotóxicos aumenta a

possibilidade de ocorrer resistência de pragas, apresentando alta toxicidade contra os inimigos naturais, com sérios danos a todo ecossistema (MONTEIRO, 1993; FARIAS et al., 2004).

A seleção de fungos entomopatogênicos, pode viabilizar o controle da lagarta-enroladeira-da-macieira de forma econômica e mais segura para o homem e o ambiente, conforme demonstrado para outras pragas e culturas (ALVES & LOPES, 2008), como preconizado pelos programas de manejo integrado (Way & van Emden, 2000; KOVALESKI & RIBEIRO, 2003). Nesse sentido, destaca-se a linhagem E6, que foi a mais virulenta e apresentou compatibilidade com tebufenozide. A compatibilidade permite a sua utilização conjunta no controle da praga alvo com maior eficiência (MOHAMED et al., 1987; PACHAMUTHU & KAMBLE, 2000; FURLONG & GRODEN, 2001; ALMEIDA et al., 2003; SILVA et al., 2005).

A perspectiva de um entomopatógeno para o controle de *B. salubricola*, traz ainda a possibilidade de manutenção dos inimigos naturais, predadores e parasitóides (BOTTON et al., 2002; MONTEIRO, et al., 2004; BORBA et al., 2006; PASTORI et al., 2007), mantendo o equilíbrio natural, diminuindo impactos ao homem e ambiente, que rotineiramente são observados nos pomares conduzidos no manejo convencional

Percebe-se principalmente nas comunidades mais esclarecidas, uma forte conscientização de que a natureza é finita em sua capacidade de absorver os resultados de todas as atividades humanas, no ritmo em que vem ocorrendo, sem que sejam alteradas as condições ambientais globais, despertando uma forte conscientização para com a agricultura. O desafio que se apresenta é a substituição dos manejos convencionais, baseados no uso intensivo, muitas vezes abusivo, de agroquímicos por um sistema alternativo, apoiado na utilização racional e eficiente destes produtos de forma a estimular os processos biológicos

do solo e manter e/ou recuperar o potencial de biodiversidade ambiental (PROTAS et al., 2003).

5. Conclusões

Considerando-se as condições experimentais em que foi realizado este trabalho, com relação aos fungos entomopatogênicos dos gêneros *Nomuraea*, *Beauveira* e *Metarhizium* como agentes de controle biológico conclui-se que:

O gênero *Metarhizium* destaca-se entre os avaliados por todas as linhagens induzirem mortalidade, duas das quais com mais de 50%;

Apenas uma linhagem (AS) de *Beauveria* induziu mortalidade;

- A sobrevivência pupal é influenciada significativamente pelos fungos, devendo ser considerado importante parâmetro para estimar os efeitos negativos que os entomapatógenos causam aos seus hospedeiros;
- A atividade enzimática do tipo-Pr1, na presença de caseína pôde ser relacionada com a velocidade do fungo em induzir mortalidade.
- A linhagem E6 de *M. anisopliae*, além de ser a mais virulenta, é compatível com tebufenozide, apresentando potencial para o controle de *B. salubricola*, principalmente se aplicada em programas de Manejo Integrado de Pragas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; LAMAS, C.; LEITE, L.G.; TRAMA, M.; SANO, A.H. (2003a) Avaliação Da Compatibilidade De Defensivos Agrícolas Na Conservação De Microrganismos Entomopatogênicos No Manejo De Pragas Do Cafeeiro. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.1, p.79-84.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A.S. (2003b) Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (HOM., CERCOPIDAE) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedade de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.1, p.101-103.
- ALVES, L.F.A.; GASSEN, M.H.; PINTO, F.G.S; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. (2005) Ocorrência Natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales:Moniliaceae) Sobre o Cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em Aviário Comercial de Cascavel, PR. *Neotropical Entomology* 34(3):507-510.
- ALVES, S. B. (1998). **Fungos Entomopatogênicos**. In: **Controle Microbiano de Insetos**, Alves, S. B. editor. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ – Piracicaba/SP. p. 289-371.
- ALVES, S.B. & LOPES, R.B. (2008) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Fealq/USP. v. 14. p. 414.
- AZEVEDO, J. L. (1998). Controle Microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: Controle Biológico, MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (eds.). **EMBRAPA** – Jaguariúna/SP. Vol. 1, p. 69-96.
- BATISTA FILHO, A, J.E.M. ALMEIDA & C. LAMAS. (2001). Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*. 30: 437-447.
- BITTENCOURTI, M.A.L. & BERTI-FILHO E. (2004) Desenvolvimento dos estágios imaturos de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera, Eulophidae) em pupas de Lepidóptera. *Revista Brasileira de Entomologia* 48(1): 65-68.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD C.L.; LIMA, A.F de. 1994. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Revista**

Universal Rural. 16:41-47.

- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. (1999) MECANISMO DE INFECÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* NO CARRAPATO *Boophilus microplus* EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.29, n.2.
- BLEIDCHER, J. (2002) Historia da macieira. In: EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **A cultura da Macieira**. Florianópolis, p.29-36.
- BONETI, J.I. da S.; CESA, J.D.; PETRI, J.L.; BLEICHER, J. (2002) Evolução da cultura da macieira. In: EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **A cultura da macieira**. Florianópolis, p.37-57.
- BORBA, R.S.; GARCIA, M.S.; KOVALESKI, A.; COMIOTTO, A.; CARDOSO, R.L. (2006) Biologia e exigências térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) sobre ovos de *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). **Ciência Rural**, v.36, n.5.
- BORGES JR., L. (1998) **Mercado Atual e perspectiva para maçã**. Reunião sobre o Sistema de Produção Integrada de Macieira no Brasil, 1999. Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 48p.
- BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. (2000a) Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera : Tortricidae) em regiões produtoras de maçã do Sul do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p.633-637.
- BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. (2000b) Controle químico da Lagarta-Enroladeira (*Bonagota salubricola* MEYRICK) na cultura da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2139-2144.
- BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. (2002) Parasitóides Associados à Lagarta-enroladeira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.341-343.
- BOUCIAS, D. G; PENDLAND, J. C. & LATGE, J.P. (1988). Nonspecific factors in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, France, p.1795-1805.
- BOUCIAS, D. G. & PENDLAND, J. C. (1991). **Attachment of mycopathogens to cuticle**. In: **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. COLE, G. T. & HOCH, H. C. (eds.). Plenum Press, New York. P. 101-124.

- BROWN, J.W.; & RAZOWSKI, J. (2003) Description of *Ptychocroca*, a new genus from Chile and Argentina, with comments on the *Bonagota* Razowski group of genera (Lepidoptera: Tortricidae: Euliini). **Zootaxa**, 303: 1-31.
- CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2005) *Boophilus microplus* Infection by fungi: a speculative review. **Current Microbiology**. 50: 257-261.
- CARDÉ, R.T.; & MIKS, A.K. (1995). Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. **Annual Review of entomology**, 40: 559-585.
- CHOCOROSQUI, V.R.; PASINI, A. (2000). Predação de Pupas de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) por Larvas e Adultos de *Calosoma granulatum* Perty (Coleoptera: Carabidae) em Laboratório. **Anais Sociedade Entomologica**. Brasil 29(1) 65.
- CLARKSON, J.M. & CHARNLEY, A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiology**. 4:197-203.
- DAIGLE, C.J.; BOETHEL, D.J.; FUXA, J.R. (1990) Parasitoids and pathogens of soybean looper and velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) in soybeans in Louisiana. **Environmental entomology**. v.19(03), p. 746-752, USA.
- 4.3.1.1. DESTÉFANO, R.H.R.; BECHARA, I.J.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E. (2005) Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against immature stages of *Anastrepha fraterculus* fruitfly (Diptera: Tephritidae) **Brazilian Journal Microbiology**, vol.36 no.1 São Paulo.
- DEVI, P.S.V. (1994) Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. V. 63(02), p.145-150, USA.
- EL-SAYED, G. N.; IGNOFFO, C.M.; LEATHERS, T.D. (1991). Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**. 113: 95-102.
- EL-SAYED, G. N.; IGNOFFO, C.M.; LEATHERS, T.D.; GUPTA, S. C. (1993). Effects of cuticle and concentration on expression of hydrolitic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**. 122: 149-152.
- ERICSSON, J.; KABALUK, J.T.; GOETTEL, M.S.; MYERS, J.M. (2007) Spinosad Interacts Synergistically with the Insect Pathogen *Metarhizium anisopliae* Against the Exotic Wireworms *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae) **Journal of Economic Entomology** v.100, n.1, p.31-38.

- FALCON, L. A., & HUBER, J. 1991. Biological control of the codling moth. Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control. **Elsevier Science Publishers**, p. 355-369.
- FARIA, M.R.; & MARTINS, C.R. (2002) Produção Integrada de Frutas – Revisão Bibliográfica. **FZVA**, Uruguaiiana, v.9, n.1, p.33-47.
- FARIA, M.R. & MAGALHÃES, B. P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 22: 18-21.
- FARIAS, M.R.; MARTINS, C.R.; NUNES, J.L.S.; GUERRA, S.D; ZANINI, C.; MARODIN, G.A.B.(2004) Análise comparativa do Custo anual de Pomar de Pessegueiro conduzido no sistema integrado e convencional na região da depressão central do RS. **Rev. Fac. Zoo. Vet. Agro**, Uruguaiiana, Vol. 10, p.87-100.
- FERRON, P. (1978) Biological control of entomogenous pest by entomogenous fungi. **Annu. Revista Entomologica**, v.23, p. 409-442.
- FERRON, P. & VINCENT, J.J. (1978) Preliminary experiments on the use of *Beauveria bassiana* against *Carpocapsa pomonella*. **Mittl. Biol. Bund. Land Fort.**, p.84-87.
- FIGUEIREDO, M.F.S., MARQUES, E.J., LIMA, R.O.R. & OLIVEIRA, J.V. (2002). Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra a Broca Gigante da Cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae). Londrina, **Neotropical Entomology**., 31 (3).
- FINNEY, D.J. (1971). *Probit analysis*, 3ª ed. London: CambridgeUniversity Press. 25p.
- FONSECA, F.L. & CAVICHIOLI, R.R. (2006) Ocorrência, monitoramento e caracterização de danos e parasitismo de noctuidae e geometridae em pomares comerciais de macieira em Vacaria, RS, Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Fedral do Paraná.
- FURLONG, M.J. & GRODEN, E. (2001) Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. **Journal of Economic Entomology**. v.94, n.2, p.344-356.
- GALLO, D., NAKANO, D.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. E.; ALVES, S. B.; VENDRAMINI, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S. & OMOTO, C. (2002). **Manual de Entomologia Agrícola**. FEALQ, Piracicaba, SP, p. 289-295.

- GARCIA-GUTIERREZ, D.; GONZALES M. M. B; MEDRANO, R. H.; HERNANDEZ C.I. 2004. Evaluación de la cepa BbP1 de *Beauveria bassiana*, Mycotrol[®], Meta-Sin[®] y azinfos-metilico contra *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en laboratorio y campo. **Folia Entomologica**. Mex., 43: 1-7.
- GIUSTOLIN, T.A.; VENDRAMIM, J.D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. 2001. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. **Neotropical Entomology**. 30(3): 417-421.
- GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. & INGLIS, G. D. (1995). The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**. 73 (1): 71-75.
- GRANDO, M. Z. (1997) **Agropecuária do Rio Grande do Sul 1980-1990: a caminho da eficiência**. Porto Alegre: Fundação de Economia e estatística Siegfries Emanuel Heuser.
- GUPTA, S.C; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. (1991). Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle. **Experimental Mycology**, 15:310-315.
- GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. (1992). Insect cuticle-degrading enzymes from the entomopathogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**. 16: 132-137.
- GUPTA, S. C.; LEATHERS, T. D.; EL-SAYED, G. N. & IGNOFFO, C. M. (1993). Purification and characterization of trypsin from an entomopathogen, *Nomuraea rileyi* NRRL13755. **Microbiology**. 27 (2): 103-107.
- GUPTA, S. C.; LEATHERS, T. D.; EL-SAYED, G. N. & IGNOFFO, C. M. (1994). Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 64:13/17.
- GRUITIÉRREZ, G.C.; MALDONADO, G.M.B.; ROLDÁN, M.H.; HERNÁNDEZ, C.I. (2004) Evaluation of the BbP1 strain of *Beauveria bassiana*, Mycotrol, Meta-Sin and azinphos-methyl against *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) in the laboratory and field. **Folia Entomológica Mexicana**, v. 43, n.1, p.1-7.
- HUMBER, R.A. & HANSEN, K.S. (2005) **Catalog of Isolates**. USDA-ARS Plant Protection Research Unit, US Plant, Soil & Nutrition Laboratory, Tower Road, Ithaca, USA.

- IBRAF, Instituto Brasileiro de Frutas. Acesso em agosto de 2006. Disponível em http://www.isca.com.br/novo/isca_com.php?menu=130300&page_id=91
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. (LSPA/Novembro de 2007). Estimativas. Consultado em janeiro de 2008, disponível em <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Infconj/ultimos/Maca.htm>
- KAAYA, G.P. (1989). *Glossina morsitans morsitans*: Mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. **Acta Tropica**, 46:107-114.
- KAAYA, G.P. & MUNYINYI, D.M. (1995). Biocontrol Potential of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse Flies (*Glossina* spp.) at Developmental Sites. **Journal Environmental Pathology**. 66:237-241.
- KAAYA, G.P. & OKECH, M.A. (1990). Horizontal Transmission of Micotic Infection in Adult Tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. **Entomophaga**, 35:589-600.
- KOVALESKI, A. Pragas. In: KOVALESKI, A. (Ed.). **Maçã**: fitossanidade. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.10-33.
- KOVALESKI, A.; BOTTON, M.; EIRAS, A. E.; VILELA, E. (1998) Lagarta-enroladeira da macieira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae): bioecologia, monitoramento e controle. Bento Gonçalves: **EMBRAPA Uva e Vinho**, 1998. 16p. (Circular Técnica 24).
- KOVALESKI, A. & RIBEIRO, L.G. (2003) Manejo de pragas na produção integrada de maçã. In: **Produção Integrada de Frutos: o caso da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. p.61-68.
- KOVALESKI, A. (1994) Eficiência dos inseticidas no controle da lagarta-enroladeira (*Phthorocroa cranaodes*) em condições de laboratório. **Horti Sul**, Pelotas, v.3, n.2, p.30-32.
- LACEY L.A. & UNRUH T.R. (2005). Control of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia* 12 (1): 33-60.
- LAEMMLI, U. K.. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227:680-685.
- LORENZATO, D. (1988) Lepidópteros nocivos em frutíferas rosáceas no Sul do Brasil.

Ipagro Informa, v.31, p.71-77.

LOUREIRO, E. de S. & MONTEIRO, A.C. (2004) Seleção de Isolados de *Beauveria Bassiana*, *Metarhizium Anisopliae* e *Paecilomyces Farinosus*, Patogênicos para Operárias de *Atta Sexdens Sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v.71, n.1, p.35-40.

MANIANIA, N.K. (1993). Effectiveness of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for control the stem borer *Chilo partellus* (Swinhoe) in maize in Kenya. **Crop Protection**, 12: 601-604.

MARUYA, W.I.; PINTO, A.S.; GRAVENA, S. (2001) Parasitóides e *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em Lagartas Desfolhadoras (Lepidoptera) na Cultura da Soja. **Bol. San. Veg. Plagas**, 27: 561-567.

McCOY, C. W. & MILANI-TIGANO, M. S. (1996). Use of entomopathogenic fungi in biological control: a word view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 27: 87-93.

MOHAMED, A.K.; PRATT, J.P.; NELSON, F.R. (1987) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. [Mycopathologia](#). v.99, n.2, p.99-105.

MONTEIRO, L. B. Controle biologique de *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) en fonction du programme de traitement contre la mouche des fruits dans la région de Vacaria (Brasil). In: CONFÉRENCE INTERNATIONALE DES RAVAGEURS EN AGRICULTURE 3., (1993), Montpellier. **Anais**. Paris: ANPP, 1993. p. 611-619.

MONTEIRO, L.B.; SOUZA, A. de; BELLI, E.L.; SILVA, R.B.Q. da; ZUCCHI, R.A. (2004). Ocorrência de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Bonagotasalubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.171-172.

MORAIS, C.K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2003). Regulation of extracellular chitinases and preteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**. 46: 205-210.

NEVES, P.M.O.J. & ALVES, S.B.(2004) Eventos externos relacionados ao processo de infecção de *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera:Termitidae) pelos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, v.33, n.1, p.51-56.

NUNES, S.; BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B.; (2006). *Bonagota salubricola*

(Meyrick), p.168-175. In C.M. Bentancourt & I.B. Scatoni (eds.), Lepidopteros de importancia económica en el Uruguay - Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. **Hemisferio Sur, Facultad de Agronomía**, 437p.

NUNES, A.R.F. (2005) Detecção de Proteases extracelulares do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* e sua virulência a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*. **Dissertação de Mestrado**. P.65.

NÜÑES, S.; GARCIA, S.; PAGANI, C.; MARSE, D. 1998. **Guia para el manejo integrado de plagas y enfermedades em frutales**. Lãs Brujas: INIA, 117 p., (INIA. Boletín de Divulgación, 66).

ONOFRE, S. B., VARGAS, L. R. B., ROSSATO, M., BARROS, N. M., BOLDO, J. T., NUNES, A. R. F. & AZEVEDO, J. L. (2002). Controle biológico de pragas na agropecuária por meios de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A., BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. L. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS, 433 p.: il.

ORTH, A.I.; RIBEIRO, L.G.; REIS FILHO, W. (1986) Manejo de pragas. In: EPAGRI. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, p.341-379.

5. PACHAMUTHU, P. & KAMBLE, S.T. (2000) In Vivo Study on Combined Toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with Sublethal Doses of Chlorpyrifos, Propetamphos, and Cyfluthrin Against German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). [Journal of Economic Entomology](#), v. 93, n.1, p. 60-70.

PARRA, J.R.P.; EIRAS, A.E.; HADDAD, M.L.; VIELA, E.F.; KOVALESKI, A. (1995) Técnica de Criação de *Phtheocroa salubricola* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae) em dieta artificial. **Revista Brasileira de Biologia**. v.55, p.537-543.

PARANHOS, B.A.J.; WALDER, J.M.M.; MARCHINI, L.C. (1998) Densidade de colméias de abelhas africanizadas, *Apis mellifera* L. 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE), para polinizar maçã cv. Anna. **Sientia Agrícola**. Piracicaba-SP, V.55, n.3.

PATERSON, I. C.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. & CLARKSON, M. (1994). Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**. 140: 3153-3159.

PASTORI, P.L.; MONTEIRO, L.B.; BOTTON, M.; PRATISSOLI, D. (2007) Capacidade de Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em Ovos de *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) sob Diferentes Temperaturas. **Neotropical Entomology**. 36(6): 926-931.

- PETRI, J.L. (2002) Fatores edafoclimáticos. In: EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **A cultura da macieira**. p.105-112.
- PINTO, J.D. (1997) Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: Fealq, p.13-39.
- PINTO, J.D.; KOOPMANSCHAP, A.B.; PLATNER, G.R.; STOUTHAMER, R. (2002) The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain *Tortricidae* (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. **Biological Control**. v.23, p.134-142.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advences Genetics**. 5: 141-238.
- PRIOR, C. (1992). In: LOMER, C. J. & PRIOR, C. eds. **Biological Control of Locusts and Grasshoppers**. CAB, Wallingford, Oxon, U.K. P.159-180.
- PROTAS, J.F.S.; SANHUEZA, R.M.V. (2003) Produção Integrada de Frutas: O Caso da Maça no Brasil. Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho. 129p.
- RAMPELOTTIL, F.T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H.F.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. Da S.; TCACENCO, F.A.; MATTOS, M.L.T. (2007) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* STAL (HEMIPTERA:PENTATOMIDAE) em condições de laboratório. SP, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v.74, n.2, p.141-148.
- RIBEIRO, L.G. (1999) Principais pragas da macieira. In: EPAGRI. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, p. 97-149.
- ROBBS, C. F. & BITTENCOURT, A. M. (1998). Controle Biológico de Insetos – O controle Biológico de Insetos Nocivos à Agricultura com o Emprego de Fungos Imperfeitos ou Hifomicetos. **Bioteχνologi Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, p. 10-12.
- ROGERIO, B.L.; SÉRGIO B.A.; LUIZ, F.L.P.; CARLOS A.P. (2007) EFICIÊNCIA DE FORMULAÇÕES DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DE NINFAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 16, 1, 27-31.
- ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; SALVES, S.B.; SILVA, E.R.L.; ALMEIDA, J.E.M. (2006). Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) **Neotropical Entomology** 35(2):231-240.
- SAMSINAKOVA, A.; MISIKOVA, S. & LEOPOLD, J. (1971). Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater max moth (*Galleria mellonella*).

Journal of Invertebrate Pathology. 18: 322-330.

- SAMUELS, R.I. & CORACINI, D.L.A. (2004) Seleção de isolados *Beauveria Bassiana* e *Metarhizium Anisopliae* para o controle de *Blissus Antillus*. **Ciência Agrícola**, Piracicaba, Brasil, v.61, n.3, p.271-275.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN. M.H. (2004). *Metarhizium anisopliae* e *Boophilus microplus*: um modelo de estudo das relações patógeno hospedeiro em biocontrole. In: XXIV Reunião de Genética de Microrganismos. **Anais**. P. 39. Gramado, RS.
- SILVA, C. A. D. (2001). Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao Bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, 36: 243-247.
- SILVA, V.C.A (2003). Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32, n.4, p.653-658.
- SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H. (2005) Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 305-312.
- SOSA-GOMEZ (2005). Seletividade de Agroquímicos para Fungos Entomopatogênicos, **Embrapa Soja**, Cx. P. 231. 86001-970, Londrina, PR.
- SRISUKCHAYAKUL, P.; WIWAT, C. & PANTUWATANA, S. (2005). Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. **Science Asia**. 31: 273-276.
- ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, V.47, p.295-302.
- ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. (1989). Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**. 13: 253-262.
- ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. (1988). Regulation of production of proteolytic enzymes by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives Microbiology**. 150: 413-416.
- ST. LEGER, R. J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J., RIZZO, N. W. & ROBERTS, D. W. (1996). Biochemical Characterization and Ultrastructural localization of two Extracellular Trypsins Produced by *Metarhizium anisopliae* in Infected Insect Cuticles. **Applied Environmental Microbiology**. 62 (4): 1257-1264.

- ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L. & ROBERTS, D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**. 64 (2): 709 – 713.
- SUWANNAKUT, S.; BOUCIAS, D.G.; WIWAT, C. 2005. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrat Pathology**. v.90, p.169-176.
- TIAGO, P.V.; & FURLANETO, M.C. (2003) O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.2, n.1, p.40-51.
- WAY, M.J. & van EMDEN, H.F. (2000) Integrated pest management in practice - pathways towards successful application. Review, **Crop Protection**, v.19, p.81-103.
- XAVIER, L.M.D. & ÁVILA, C.J. (2006) Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera, Cydnidae) **Revista Brasileira de Entomologia**. vol.50 no.4 São Paul