

ASPECTOS BIOLÓGICOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
Aschersonia sp. **CULTIVADO EM DIFERENTES MEIOS DE**
CULTURA

IURI MONTANDON DE OLIVEIRA

2008

IURI MONTANDON DE OLIVEIRA

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
Aschersonia sp. CULTIVADO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Alcides Moino Junior

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Iuri Montandon de.

Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp.
cultivado em diferentes meios de cultura / Iuri Montandon de Oliveira. –
Lavras : UFLA, 2008.

47 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Alcides Moino Junior.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. *Aschersonia*. 3. Produção de fungos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.240461

IURI MONTANDON DE OLIVEIRA

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
Aschersonia sp. CULTIVADO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 08 de maio de 2008

Prof. José Eduardo M. de Almeida

Instituto Biológico de São Paulo

Prof. Ricardo Souza Cavalcanti

UNIFENAS

Prof. Alcides Moino Junior
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força que me fez atravessar incansável, por todas as portas, pontes e elos, pela capacidade inesgotável de querer sonhar. Pelos horizontes sempre à frente, pela capacidade de buscar. Pela saúde perfeita, liberdade, independência.

À Universidade Federal de Lavras, UFLA, pela oportunidade de aprender um pouco mais sobre a Entomologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador Prof. Dr. Alcides Moino Júnior, do DEN/UFLA, por todos os conselhos e confiança, mas, principalmente, por toda a paciência.

Aos professores Dr. José Eduardo Marcondes Almeida, do Instituto Biológico de São Paulo; Dr. Ricardo Sousa Cavalcanti, da UNIFENAS – Faculdade de Agronomia e Dr. Luis Cláudio Paterno Silveira, DEN/UFLA, por terem aceitado o convite e por toda a contribuição intelectual.

Ao Prof. Dr. Neliton Marques da Silva, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, pela cessão do isolado de *Aschersonia aleyrodis*.

Ao Marco Aurélio, por ter sido um grande irmão pra mim. Pelas conversas de alto teor intelectual e de extrema importância para todos. A todos os momentos esportivos que passamos juntos, sejam eles no xadrez, no futebol ou na peteca e, principalmente, por ter me aturado por dois anos, mesmo querendo, por vezes, me despejar.

À Cristhiane, minha eterna veterana, por toda força e companheirismo em todos os momentos, sejam eles felizes ou não. Pelas incontáveis risadas e “brigas” que tivemos, pelos conselhos. Por ser sempre minha parceira em qualquer forró.

Ao Fabiano, por ser um grande companheiro de conversa, dando-me apoio e forças em momentos em que eu achei que tudo fosse desmoronar. Pelos inúmeros conselhos, embora, infelizmente, não tenha seguido a todos.

Aos colegas de mestrado (Alexandre, Bruno e Thaiana), por toda a convivência durante o período do mestrado.

Aos colegas de mestrado que se tornaram amigos, quase irmãos, Cleidson, Heisler e Roberta, por todos os momentos que passamos juntos, por todas as risadas e momentos felizes compartilhados.

Aos companheiros de churrasco e jogatina, Natália, Marlon e Daiane.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia, DEN, por toda a cooperação no decorrer deste período.

Aos professores do Departamento de Entomologia, DEN, por todo o ensinamento.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia de Insetos (Grazielle, Vanessa e Érica). Em especial, a Viviane, que me ajudou na montagem de experimento até altas horas da noite.

Ao meu pai, Luiz Carlos, pelo apoio incondicional em todos os momentos, mesmo sofrendo tanto quanto eu pela longa ausência e distância. Pelo eterno exemplo de sabedoria, amor e confiança.

À minha mãe, Léia, pessoa de personalidade única, sempre alegre, fazendo as suas sacanagens, dando os seus conselhos, às vezes não tão úteis, mas sempre presentes. Pelas vezes que me deu colinho, ouvindo as minhas lamentações, mas sempre me dando força pra continuar.

Ao meu irmão Igor, meu companheiro para todos os momentos, inseparável, com uma energia de vida enorme, sempre sorrindo, sempre brincando, alguém que pode contar comigo sempre.

À minha irmã Natila, por ser tão alegre, querida, empenhada e com um temperamento forte. Por todos os momentos e instantes, inclusive aqueles em

que o choro parecia ser a melhor opção.

Aos meus melhores amigos, Halison e André que, mesmo distantes, de alguma maneira estavam sempre presentes. Pelos inúmeros momentos que passamos juntos, rindo um da cara do outro, mas também por aqueles momentos sérios de estudos e de aconselhamentos, embora não tenham adiantado muito ao Halison, que acabou se casando.

A todos os colegas de pós-graduação que, com certeza, auxiliaram muito para esta dissertação.

Ao período que passei na UNIOESTE, onde fiz muitos amigos e adquiri o conhecimento necessário para que eu chegasse onde estou neste momento.

E a todos, não poucos, que um dia passaram por meu caminho nos incontáveis quilômetros percorridos, me conduzindo até aqui, trazendo um novo sentido a minha vida, mesmo que por instantes tão pequenos e aparentemente insignificantes.

A todos, muito obrigado.

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Controle microbiano de insetos	4
2.2 Fungos entomopatogênicos	5
2.3 <i>Aschersonia aleyrodís</i> Webber.....	8
2.4 Fatores que influenciam a virulência.....	9
2.5 A família Aleyrodidae Westwood 1840	13
2.5.1 <i>Aleurocanthus woglumi</i> Ashby 1915.....	14
2.5.2 <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius, 1889)	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material biológico	21
3.2 Inoculação dos isolados nos meios de cultura	22
3.3 Bioensaios	22
3.3.1 Viabilidade dos conídios	22
3.3.2 Crescimento radial das colônias	23
3.3.3 Conidiogênese	23
3.3.4 Virulência sobre <i>Bemisia tabaci</i>	23
3.3.5 Análise estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Viabilidade dos conídios	26
4.2 Crescimento radial de colônias.....	28
4.3 Conidiogênese	29
4.4 Virulência	32
5 CONCLUSÕES	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	45

RESUMO

OLIVEIRA, Iuri Montandon. **Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp. cultivado em diferentes meios de cultura.** 2008. 47 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Possibilitar a produção em grande escala de fungos entomopatogênicos e o seu uso no controle biológico de pragas e conhecer algumas características são extremamente importantes para a obtenção de um bom crescimento com alta conidiogênese. O presente trabalho objetivou avaliar a influência de meios de cultura baseados em fontes protéicas, principalmente provenientes de insetos, sobre parâmetros biológicos do fungo *Aschersonia aleyrodis*. Os experimentos de viabilidade, crescimento radial e conidiogênese foram realizados em seis meios de cultura: ME, SMAY, SDAY, BDA, BDAGm (BDAGm) e BDA + *Tenebrio* sp. (BDAT). A virulência deste fungo foi avaliada em *Bemisia tabaci* biótipo “B” utilizando-se de três meios de cultura (BDA, BDAGm e BDAT). A viabilidade foi avaliada em meio AA, após um período de incubação de 24 horas, enquanto o crescimento vegetativo e a conidiogênese foram avaliados nos diferentes meios incubados em B.O.D. ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase) por 10 dias. Verificou-se maior viabilidade nos meios ME, BDA, BDAGm e BDAT, com valores equivalentes a 76,3%, 78,4%, 78,7% e 83,3%, respectivamente. Quanto ao crescimento radial, os melhores valores foram obtidos quando o fungo foi produzido em meio BDAT, com média de 13,8 cm/colônia. Este mesmo meio foi o que promoveu o maior aumento na conidiogênese, quantificada em $4,8 \times 10^6$ conídios/colônia. O fungo produzido nos meios BDAGm e BDAT proporcionou melhores resultados quanto à virulência em *B. tabaci*, com valores iguais a 80,0% e 85,6% de mortalidade, respectivamente, sugerindo a influência positiva dos componentes provenientes de insetos adicionados à composição do meio de cultura.

¹ Orientador: Alcides Moino Junior - UFLA

ABSTRACT

OLIVEIRA, Iuri Montandon. **Biological aspects of the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. cultivated in different culture media.** 2008. 47p. Dissertation (Master degree in Entomology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.²

To enable the production on a large scale of entomopathogenic fungi and allow their use in biological control of pests, knowing some characteristics is very important for achievement of good growth with high sporulation. The goal of this work was to evaluate the influence of different culture media based in protein sources, mainly that ones coming from insects, on biological parameters of the fungus *Aschersonia aleyrodis*. The viability, radial growth and conidia production bioassay were developed in six different media: ME, SMAY, SDAY, BDA, BDAGm (BDAGm) e BDA + *Tenebrio* sp. (BDAT). The virulence of this fungus was evaluated in *Bemisia tabaci* biotype "B" using up three culture media (BDA, BDAGm e BDAT). The viability was evaluated in Water-Agar after a time incubation of 24 hours, while the vegetative growth and conidia production were evaluated on different media incubated in B.O.D. (26±1°C, 14 hours of fotofase) for ten days. There was a higher viability in ME, BDA, BDAGm e BDAT media, with equivalent values to 76.3, 78.4, 78.7 e 83.3%; respectively. For the radial growth, the best values were obtained when the fungus was produced in BDAT, with 13.8 cm/colony. This was the same media that promoted the largest increase in conidiogenesis, quantified in 4.8 x 10⁶ conidia/colony. The fungus produced in media BDAGm and BDAT provided better results on the virulence in *B. Tabaci*, with values equal to 80.0 and 85.6% of mortality, respectively, suggesting the positive influence of the components from insects added the composition of the culture medium.

² Advisor: Alcides Moino Junior

1 INTRODUÇÃO

Devido à grande diversidade de cultivares e climas nos quais os citrus se desenvolvem, talvez esta seja uma das culturas com maior área de distribuição que vai desde áreas com clima tropical e subtropical a áreas de clima temperado ao redor do mundo. Conseqüentemente, uma grande variedade de organismos-praga é relatada para os citros (Dolinski & Lacey, 2007).

Uma família que merece destaque como praga, devido à atual situação na qual se encontra é a Aleyrodidae, na qual se concentram pragas chave de muitas culturas em regiões tropicais e subtropicais, além de ocorrerem em áreas de cultivo protegido em regiões de clima temperado (Brown et al., 1995). Entre estas se destacam as moscas-brancas, *Aleurothrixus floccosus* (Mask., 1895) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE), as mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* (Ashby, 1915) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) (Gallo et al., 2002; Dolinski & Lacey, 2007). São relatadas cerca de 30 espécies de moscas-branca e de moscas-negra-dos-citros atacando citros ao redor de todo o mundo (Smith & Pena, 2002, citado por Dolinski & Lacey, 2007).

Muitas características biológicas, incluindo o multivoltismo, grande variedade de hospedeiros, habilidade migratória, altas taxas reprodutivas, tolerância a altas temperaturas, possibilidade de ser vetor de ma grande variedade de vírus fitopatogênicos e a facilidade de desenvolver resistência a várias classes de inseticidas sustentam o potencial para se tornarem pragas e têm contribuído para dificultar o desenvolvimento de sistemas de manejo sustentáveis (Gerling & Mayer, 1996, citado por Naranjo, 2001).

A principal forma de controle dessas pragas é o uso de inseticidas à base de moléculas orgânicas e inorgânicas. Os estudos sobre controle biológico de insetos considerados pragas de importância econômica foram intensificados a

partir do momento em que se observou que o uso contínuo e indiscriminado dos inseticidas acarretava problemas de resistência de insetos aos produtos químicos, contaminação direta e indireta do ambiente, desequilíbrio ecológico e presença de resíduos em alimentos. Sendo assim, uma alternativa para o controle dessas pragas é o uso de microrganismos, particularmente os vírus, as bactérias e os fungos (Azevedo & Messias, 1985; Alves, 1998).

Estudos indicam que os fungos são os principais causadores das doenças de insetos. Cerca de 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos os fungos pertencentes a 90 gêneros e mais de 700 espécies. Além disso, uma das principais vantagens no controle microbiano de insetos por fungos é a grande variabilidade genética desses entomopatógenos. Portanto, com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos mais virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos visando ao controle do maior número possível de pragas de culturas econômicas (Alves, 1998).

Aschersonia aleyrodis Webber (1897) é um fungo que, segundo Browning & McCoy (1994), citados por Alves (1998), constitui um dos agentes mais importantes que atuam no controle natural de pragas de citros. Ataca cochonilhas e aleirodídeos na fase de conídios de coloração avermelhada que recobrem todo o corpo do inseto, sendo comumente observado em epizootias naturais.

A produção de conídios e a virulência dos fungos podem ser afetadas por diversos fatores, tais como umidade relativa, temperatura, isolado selecionado, hospedeiro, tempo e a composição do meio de cultura (Alves, 1998). Portanto, sendo o meio de cultura um determinante de diversos caracteres, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, a conidiogênese e a virulência de um isolado de *Aschersonia* sp. sobre adultos de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), cultivado em diferentes meios de cultura.

Assim, este trabalho poderá trazer maior entendimento acerca da influência direta dos componentes do meio de cultura sobre algumas características do fungo *Aschersonia* sp. E, nesse sentido, é importante correlacionar a composição do meio de cultura sobre alguns caracteres (viabilidade de conídios, crescimento radial, produção de conídios e virulência) e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias de manipulação deste fungo, a fim de viabilizar a utilização do mesmo em programas de manejo integrado de pragas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Controle microbiano de insetos

Os produtores, preocupados com as exigências do mercado interno e externo por produtos de alta qualidade, lançam mão do uso de produtos químicos para o controle de pragas, causando danos ecológicos, prejudicando o solo e deixando resíduos nos alimentos, quando aplicados de maneira indiscriminada (Chenarki et al., 2001).

Após algumas décadas, o grande interesse foi a utilização de pesticidas químicos, diminuindo bastante a demanda por agentes de controle biológico. Entretanto, este interesse foi retomado em 1960 (Evans & Hywel-Jones, 1990). O controle biológico de insetos praga é uma maneira muito mais segura de manter as populações em equilíbrio, limitando a rápida multiplicação destes, não causando dano algum aos organismos não-alvo e ao solo (Alves, 1998).

O uso de microrganismos para o controle de insetos-praga não é novo e vem sendo empregado em grande escala, principalmente após os anos 1970, devido a problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos. Assim, vírus, fungos e bactérias são empregados com sucesso no controle de diversos tipos de pragas e outros vários são pesquisados para futura utilização (Melo & Azevedo, 1998).

A utilização de microrganismos entomopatogênicos para o controle de pragas não é uma área de conhecimento recente, mas tomou grande impulso, principalmente após a proibição do uso de inseticidas organoclorados e também em decorrência do estabelecimento do manejo integrado de pragas (MIP) como prática racional no controle de insetos-praga (Moino Jr., 2000).

A utilização de microrganismos para o controle de insetos apresenta diversas vantagens, tais como: (1) protege a biodiversidade, agindo no

ecossistema; (2) não causa desequilíbrio, pois os entomopatógenos são específicos, não afetando organismos não-alvo, como os polinizadores, mas agindo com grande poder patogênico nos organismos alvo; (3) não deixa resíduos em alimentos, água ou solo, mesmo em doses elevadas; (4) aumenta o lucro do produtor, pois tem maior duração sem a necessidade de uma nova aplicação, afetando as gerações seguintes, diminuindo a oviposição, a viabilidade dos ovos e aumentando a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos; eles podem ser empregados juntamente com inseticidas seletivos em subdosagens visando à ação sinérgica e, portanto, um controle mais rápido e eficaz da praga, sem os inconvenientes das superdosagens dos inseticidas químicos; (5) os insetos dificilmente se tornarão resistentes aos patógenos e (6) não necessita de matéria-prima, como o petróleo, para serem produzidos. Entretanto, fatores como o planejamento das aplicações, respeitando-se o período de incubação do patógeno, de modo que o inseto possa ser eliminado antes de prejudicar economicamente a cultura, e a necessidade de um conhecimento tecnológico, às vezes de difícil implementação, especialmente pelo nível cultural do agricultor, podem ser encarados como desvantagens (Alves, 1998).

As técnicas de produção massal desses controladores biológicos, a otimização dos processos de aplicação e o melhoramento genético dos microrganismos empregados, tornando-os mais eficientes, vêm sendo desenvolvidos em laboratórios de todo o mundo (Leite et al., 2003).

2.2 Fungos entomopatogênicos

Juntamente com predadores e parasitóides, vários entomopatógenos são encontrados causando doenças em indivíduos da família Aleyrodidae por todo o mundo. Muitos fungos estão sendo considerados para o controle biológico (Lacey et al., 1996). Para selecionar fungos patogênicos para o controle de

aleirodídeos é necessário selecionar isolados que combinem as melhores características possíveis para matar o inseto alvo. Uma das características é a boa produção massal, bem como a alta conidiogênese em meios de cultura artificiais (Moore & Prior, 1993; Prior, 1992, citados por Meekes et al., 2002). Muitos fungos, tais como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith e *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Gams & Zare, têm sido desenvolvidos como produtos comerciais (Bolekmans et al., 1995) (Knauf and Wright, 1994; Ravensberg et al., 1990, citados por Meekes et al., 2002). Pesquisas anteriores indicaram que *A. aleyrodis* também é um promissor agente de controle devido à sua tolerância a umidades relativas inferiores a 50% e à sua longa persistência em superfícies foliares (Fransen, 1995).

Avanços na qualidade dos micoinseticidas abrirão nichos antes não vislumbrados. A pressão crescente da sociedade por alimentos mais saudáveis, a conscientização de profissionais do setor agropecuário brasileiro quanto às adversidades causadas pelo uso abusivo de agrotóxicos e quanto à necessidade de inclusão do controle biológico em estratégias de manejo de resistência de insetos-praga, a implantação de legislações cada vez mais restritivas ao emprego de produtos químicos e a expansão da agricultura orgânica e do cultivo protegido, entre outros fatores, provavelmente, reverterão, nos próximos anos, em demanda consideravelmente maior do que a atualmente observada. Resta, então, às biofábricas investir no aumento de produtividade e na constante melhoria de seus produtos (Faria & Magalhães, 2001).

Diferentemente das bactérias e vírus entomopatogênicos que invadem o hospedeiro através do aparelho bucal (ingestão), os fungos possuem a capacidade de penetrar ativamente pelo tegumento, devido a uma ação combinada de pressão mecânica e ação de enzimas e, após a penetração, proliferam na hemocele e, em seguida, produzem toxinas. Tais eventos podem

culminar com a morte do animal. Assim, a produção de enzimas e toxinas é um importante fator de virulência de um fungo entomopatogênico (Alves, 1998).

O processo de infecção de fungos em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (Schrack et al., 1993). Inicialmente, encontrando condições favoráveis de umidade e temperatura, o fungo forma um tubo germinativo; na extremidade deste tubo forma-se uma dilatação, denominada apressório, cuja porção inferior apresentará uma saliência (grampo de penetração), a qual penetra no tegumento do inseto. Na penetração estão envolvidos dois processos principais: um físico (pela pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e um químico (resultante da elaboração de enzimas que facilitam a pressão mecânica). A hifa que penetra sofre engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento e, posteriormente, na cavidade geral (Hemocele); a partir de então, formam-se pequenas colônias do fungo (Alves, 1998).

Durante a penetração da cutícula, componentes cuticulares devem ser hidrolisados pelas enzimas produzidas e liberadas pelo fungo, que incluem proteases, quitinases e lipases. Quando essas enzimas conseguem promover uma abertura na cutícula do inseto hospedeiro, uma saliência conhecida como grampo de penetração é introduzida, iniciando a infestação da hemocele do inseto (Shimizu et al., 1992).

Devido ao modo de infecção do fungo, que se dá principalmente através da cutícula, a utilização de fungos é uma solução viável como agente de controle de insetos sugadores, entre eles os da ordem Hemiptera (Alves, 1998; Dolinski & Lacey, 2007).

A morte do inseto ocorre devido a fatores como produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento vegetativo e outros danos físicos em decorrência do crescimento do micélio. Tal evento ocorre de quatro a cinco dias

após a infecção, quando as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos. Após o esgotamento dos nutrientes, as hifas se estendem para fora do corpo do hospedeiro, formando um micélio que recobre a superfície do tegumento, resultando na mumificação. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de conídios, que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros insetos (Alves, 1998).

Devido à segurança atribuída aos fungos entomopatogênicos, especialmente em relação aos animais homeotérmicos (Crawford et al., 1998), maiores conhecimentos acerca dos fatores de virulência permitirão o desenvolvimento de novas metodologias de cultivo e aplicação, com a finalidade de elevar as taxas de mortalidade associadas aos mesmos e reduzir a utilização de controladores químicos, diretamente nocivos tanto para os animais quanto para o ambiente.

2.3 *Aschersonia aleyrodís* Webber

O gênero *Aschersonia* é conhecido por causar severa epizootia em moscas-brancas (Aleyrodidae) e em alguns coccídeos nas regiões tropicais e subtropicais (Meeke et al., 2000). As espécies que atacam moscas-brancas infectam, principalmente, o estágio imaturo. Embora seja considerado um dos gêneros mais estudados para o controle de insetos (Alves, 1998) e cerca de 23 espécies tenham sido descritas em moscas-brancas, pouco se conhece sobre sua efetividade no controle de aleirodídeos (Meeke et al., 2002).

A. aleyrodís foi um dos primeiros fungos utilizados no controle biológico de insetos pragas na América do Norte. O sucesso no seu uso em culturas de citrus na Flórida já é relatado desde 1900, quando citros com conídios de *A. aleyrodís* foram introduzidos em culturas de citros a fim de iniciar epizootias na população de moscas-branca (Berger, 1921 e Fawcett, 1936 citados por Liu et al., 2006).

A. aleyrodis é um fungo que segundo Browning & McCoy (1994), citado por Alves (1998), constitui um dos agentes mais importantes que atuam no controle natural de pragas de citros. Atacam cochonilhas e moscas-brancas na fase conidial. Na fase ascógena, é *Hypocrella* (Ascomycetes) e ocorre sobre coccídeos. Os conídios são hialinos, fusóides unicelulares, originados em picnídios formados na cavidade de um estroma hemisférico de coloração avermelhada que recobre todo o corpo do inseto. É considerado o maior inimigo natural das moscas-branca *Dialeurodes citri* Ashmead (HEMIPTERA; ALEYRODIDAE) e *Dialeurodes citrifolii* (Morgan) (HEMIPTERA; ALEYRODIDAE), em diferentes regiões do país. É muito comum ser observado em epizootias naturais.

Na Bulgária, na China, no Japão e na União Soviética, *A. aleyrodis* foi utilizado contra moscas-branca em casas de vegetação. O fungo foi desenvolvido comercialmente pela Koppert Biological Systems, na Holanda, como um biopesticida adequado para aplicação em estufas (Evans & Hywel-Jones, 1990).

No entanto, permanecem alguns obstáculos: espécies de *Aschersonia* apresentam culturas de crescimento lento e nem todas as fases de vida do hospedeiro pode ser atacado (Ramakers & Samson 1984 citado por Liu et al. 2006). Estudos recentes sobre conidiogênese, germinação, e patogenicidade permitiram melhor compreensão da biologia de *A. aleyrodis*, a fim de desenvolver ainda mais este promissor agente no controle biológico (Meekes et al., 2002).

2.4 Fatores que influenciam a virulência

Vários fatores de patogenicidade estão envolvidos na colonização do hospedeiro pelos fungos, tornando esse mecanismo bastante complexo. Dentre estes fatores, está a produção de toxinas e de exoenzimas. Na maioria dos casos,

a infecção do inseto inicia-se com a deposição de conídios sobre a cutícula e ou penetração mecânica (Heale et al., 1989; Lecuona et al., 1991).

Na superfície do conídio, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas que têm efeito de adesão, na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações superficiais nas camadas externas da cutícula do hospedeiro (St. Leger et al., 1989). O conídio é o propágulo mais adequado para uso no controle biológico, já que é a mais resistente às condições adversas do ambiente, podendo ser preservado por um tempo relativamente longo (Abreu et al., 1983 citados por Leite et al., 2003). Além disso, os conídios são hidrófobos, o que favorece a sua adesão na cutícula do hospedeiro (Boucias et al., 1988).

Após a infecção via tegumento, dependendo da presença de nutrientes (glicose, quitina, nitrogênio, entre outros), o fungo germina de 12 a 18 horas. A penetração tegumentar ocorre devido à ação mecânica e enzimática (Alves, 1998).

As enzimas, dentre elas as quitinases, são liberadas pelo tubo germinativo, que tem fundamental importância na degradação da cutícula do inseto, favorecendo o processo nutricional entre o fungo e o hospedeiro. A produção de enzimas pelos fungos tem sido estudada com várias finalidades. Uma delas é correlacioná-la com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência (Alves, 1998).

Paris & Segretain (1978), citados por Alves (1998), relataram que a virulência de *B. bassiana* estava relacionada à produção de lipases, o que facilitaria a seleção de raças com essas características. As lipases são responsáveis pelo fracionamento dos lipídeos (óleos e gorduras) existentes na superfície dos insetos, para posterior metabolização pelos microrganismos. Os alcanos da camada de lipídeos da epicutícula podem ser utilizados como fonte de nutrientes para os estágios iniciais de desenvolvimento dos fungos (St. Leger et al., 1988).

Gupta et al., (1992) analisaram a produção de proteases por *B. bassiana* e relataram a importância de estudar vários isolados, já que as diferenças quantitativas na produção de proteases por diferentes isolados podem influenciar diretamente a virulência do fungo. A importância de analisar a variabilidade entre isolados quanto à produção de proteases é reforçada pelos dados de Leal et al. (1997), os quais demonstraram variação significativa na seqüência de nucleotídeos do gene PR1, que codifica para síntese de enzimas específicas, entre diferentes isolados de fungos entomopatogênicos.

A composição do meio tem uma estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, o formato e a quantidade de propágulo produzido, além da sua estabilidade após secagem e de sua agressividade, medida em termos de virulência e patogenicidade. Portanto, no desenvolvimento de um meio de cultura, é importante selecionar um meio definido ou semidefinido que proporcione uma boa produção da forma desejada do fungo, variando os componentes do meio, analisando o impacto na produção, virulência, capacidade de suportar processos de secagem e estabilidade do patógeno (Jackson, 1997).

Um meio de cultura deve possuir, basicamente, uma fonte de carbono (amido, glicose, sacarose, dextrose e diversos outros açúcares) e nitrogênio (extrato de soja e outros subprodutos vegetais, extrato de levedura e peptona ou até mesmo ácido casamino), sais minerais e alguns fatores de crescimento (Leite et al., 2003).

A utilização de meios sólidos, por não precisar de tecnologias mais aprimoradas, é a forma mais comum na produção de fungos entomopatogênicos, inclusive em escala comercial. Neste tipo de substrato, o crescimento e a conidiogênese do fungo se dão sobre o substrato solidificado pela presença do ágar, por exemplo, ou de outros agentes solidificantes (Moino Jr., 2000). Essa forma de produção de fungos tem sido utilizada para a manutenção rotineira de

isolados e a produção em pequena escala de conídios, visando estudos de laboratório, bem como para a produção em média e grande escala, visando testes de campo e comercialização. O fungo é produzido na superfície do meio sólido, dentro de diferentes recipientes, conforme o objetivo e a escala da produção (Leite et al., 2003).

A conidiogênese em substratos sólidos é vantajosa, pois a maioria dos fungos, naturalmente, realiza este processo em substratos sólidos, além de ser facilmente mantido em laboratório. Geralmente, os conídios produzidos dessa maneira tendem a ser mais tolerantes a dissecações e mais estáveis em ambientes secos, comparados àqueles produzidos em meio líquido (Jackson, 1997).

O sucesso no uso do meio sólido para a produção de fungos entomopatogênicos deve-se tanto ao mercado existente para o produto em locais com elevado desenvolvimento tecnológico quanto ao mercado baseado em baixos custos operacionais, como é o caso da produção em países considerados de terceiro mundo (Jackson, 1997).

Os conídios são os principais veículos para dispersão, transmissão e persistência de fungos entomopatogênicos. Para que os conídios iniciem a infecção, eles devem entrar em contato com a cutícula do inseto, germinar e, então, realizar a penetração (James, 2001).

Para um controle efetivo, os conídios, que são as unidades infectantes, devem possuir alta viabilidade (isto é, alta habilidade para germinar) e virulência contra o inseto praga a ser controlado. Os efeitos de diversos fatores ambientais, incluindo temperatura, umidade, luz e concentração de gases na estabilidade de conídios entomopatogênicos, vêm sendo constantemente examinados. Assim como a viabilidade, a virulência do conídio deve ser mantida, mesmo após certo período de estocagem do fungo, para que ela seja considerado um agente de controle microbiano efetivo (Daoust & Roberts, 1982).

A germinação do conídio é um fator de grande importância na determinação da virulência de um fungo entomopatogênico. Drummond et al. (1987) demonstraram que isolados de *L. lecanii* mais virulentos germinaram mais rápido na superfície do inseto que isolados pouco virulentos. Em diversos experimentos com diferentes espécies de fungos, a utilização de conídios já germinados induziu a uma taxa de mortalidade maior e infecção mais rápida do que conídios não-germinados.

Experimentos baseados na determinação da viabilidade de conídios sofrem algumas dificuldades e limitações, tais como a dificuldade na diferenciação de conídios não-germinados entre vivos e mortos; o tempo e o trabalho requeridos para um válido e completo estudo; a influência dos efeitos ambientais e substratos na germinação (Firstencel et al., 1990).

Previamente aos bioensaios com fungos entomopatogênicos, torna-se necessário o teste de viabilidade, que é feito, em geral, utilizando-se meio batata-dextrose-ágar (BDA) ou agar-água (AA). Dependendo do meio em que germinam, diferentes isolados de uma mesma espécie podem se comportar de maneira diferente quanto à germinação (Francisco et al., 2003).

2.5 A família Aleyrodidae Westwood 1840

A família Aleyrodidae, à qual pertencem a mosca-branca e a mosca-negra-dos-citros, inclui 166 gêneros e 1.551 espécies, divididas em duas subfamílias viventes (Aleurodicinae e Aleyrodinae) e uma fóssil (Bernaeinae). A classificação genérica dos insetos desta família é baseada em estruturas do quarto instar larval, também chamada de “pupário”, e não em estruturas de adultos (Evans, 2007). Uma grande vantagem dessa identificação é que os pupários são sésseis, sendo possível coletar e identificar plantas hospedeiras com insetos. Infelizmente, algumas espécies polífagas variam a aparência de seus pupários, dependendo da forma da cutícula da planta hospedeira na qual se

desenvolveram. Esta variação tem causado um número significativo de identificações erradas e, portanto, deduções de associações com plantas hospedeiras devem ser feitas com cautela (Mound & Halsey, 1978, citados por Byrne & Bellows Jr., 1991).

Os aleirodídeos estão amplamente distribuídos geograficamente e vivem sobre um grande número de plantas silvestres e ornamentais. Entretanto, diversas espécies têm sido apontadas como pragas de culturas de importância econômica, por simplesmente sugarem a seiva das plantas, outras por transmitirem viroses e substâncias toxicogênicas, por facilitarem o ataque de patógenos ou proporcionarem o aparecimento de fumagina sobre seus dejetos (Cassino & Nascimento, 1999).

Morfologicamente, os aleirodídeos são semelhantes aos pisilídeos, embora ecologicamente sejam equivalentes, nos trópicos, com afídeos, insetos oportunistas com populações transitórias. O aparato bucal é similar ao dos pisilídeos, mas, em contraste com este, a antena possui menos antenômeros e as asas posteriores menos nervuras (Mound & Halsey, 1978 citado por Byrne & Bellows Jr., 1991).

2.5.1 *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1915

O gênero *Aleurocanthus* pertence à subfamília Aleyrodinae e apresenta cerca de 80 espécies, distribuídas por todas as regiões do globo, embora apenas a espécie *Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1915 tenha relatos de ocorrência em todas elas (Evans, 2007).

A mosca-negra-dos-citros, *A. woglumi*, é originária do Sudoeste da Ásia e encontra-se disseminada em grande parte do mundo (África, Américas do Norte, Central e do Sul). O seu primeiro relato ocorreu na Flórida em 1934, sendo erradicada com sucesso. Entretanto, em 1976, foi relatada novamente na área de Lauderdale. Desta vez, a infestação ocorreu mais difusa e a sua erradicação

julgada mais difícil, se não impossível. Muitas vespas parasitóides foram liberadas e duas delas realizaram excelente trabalho no controle da infestação. Entre os hospedeiros preferidos de *A. woglumi* estão a manga e os citros. Altas infestações por mais de um ano podem causar rápida deterioração das frutíferas. Esses aleirodídeos são mais comuns na metade inferior das árvores de citros (Fasulo & Brooks, 2001).

Em 1999, a Instrução Normativa nº 38, do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), apresentou uma lista de pragas quarentenárias para o Brasil, considerando *A. woglumi* como uma praga em potencial, mas ainda não presente no país (Brasil, 1999). Entretanto, em julho/2001, foi relatada a sua ocorrência no Pará (Oliveira et al., 2001), sendo, posteriormente, registrada no Maranhão em 2003, nas cidades de Boa Vista do Gurupi, Imperatriz e Bacabal, em pomar de citros com dez anos. Em 2004, ainda no Maranhão, novos registros foram feitos em Barra do Corda e em São Luís, em citros e mangueira, verificando-se, naquela ocasião, a presença de mais de 100 pupários/folha (Lemos et al., 2006). Em dezembro de 2007, na Instrução Normativa nº 59, foi feita nova lista de pragas quarentenárias (A2), na qual há o relato da ocorrência desta praga nos estados do Amapá, do Amazonas e de Tocantins (Brasil, 2007).

Em 2008, um laudo do Instituto Biológico de São Paulo confirmou a ocorrência dos primeiros focos da mosca-negra-dos-citros em pomares na região noroeste do Estado de São Paulo (Porto, 2008).

Para o estado de Minas Gerais ainda não foi relatada a ocorrência desta praga, mas, ainda assim, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) desenvolve ações de prevenção. Nas últimas semanas, a preocupação com a mosca-negra cresceu no país, devido à identificação de focos em São Paulo e em Goiás (Agência Minas, 2008).

O impacto negativo da introdução da mosca-negra-dos-citros em regiões produtoras de frutas pode ter conseqüências desastrosas, não somente sob o ponto de vista econômico, mas, também, o ambiental. Isso se deve aos efeitos que as medidas de controle adotadas podem ter sobre os recursos naturais quanto ao dano da praga na flora nativa e, ainda, à sua possível adaptação a outras espécies comerciais, no momento não consideradas hospedeiras (Barbosa & Paranhos, 2004).

A mosca-negra-dos-citros representa uma ameaça à citricultura brasileira por ser uma praga quarentenária de alerta máximo (Batista et al., 2002; Lemos et al., 2006), uma vez que são desconhecidas as formas de controle. Até 2004, ainda não existiam recomendação oficial e registro, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, de produtos inseticidas para o controle dessa praga (Lemos et al., 2004). Entretanto, vários inseticidas foram testados para o seu controle, tais como monocrotofós, oxydemeton-metil, fosfamidon e dimetoato, que são os mais usados (Barbosa & Paranhos, 2004).

A mosca-negra ataca mais de 300 espécies de plantas (Nguyen & Hamon, 1993), tendo como hospedeiros principais citros, caju e abacate. Porém, em elevada densidade populacional, os adultos se dispersam para outras plantas hospedeiras, como roseiras, macieiras, cafeeiros, mangueiras, figueiras, mangueiras, goiabeiras, bananeiras, videiras, mamoeiros, pereiras, marmeleiros e romãzeiras (Oliveira et al., 2001).

Tanto os adultos como as formas imaturas da mosca-negra causam danos, pois se alimentam de grande quantidade de seiva, deixando a planta debilitada, levando-a ao murchamento e, em muitos casos, à morte. Além disso, eliminam uma excreção açucarada, induzindo o aparecimento de fungos saprófitos que, por serem escuros, formam a chamada fumagina que, em grande quantidade, reveste folhas, frutos e ramos, reduzindo a fotossíntese, impedindo a respiração da planta e diminuindo o nível de nitrogênio nas folhas. Em elevada quantidade,

a fumagina interfere na formação dos frutos, reduzindo seu valor comercial. Os prejuízos podem variar de 20% a 80% na produção (Oliveira et al., 2001; Barbosa & Paranhos, 2004).

A mosca-negra ocorre durante todo o ano, entretanto, a sua reprodução é baixa nos meses mais frios e chuvosos (Barbosa & Paranhos, 2004). Os ovos, que são alongados e de coloração branco-cremosa, são depositados em espiral na face abaxial das folhas, em grupos de 35 a 50. As fêmeas põem, em média, 100 ovos durante seu ciclo de vida. A eclosão das ninfas ocorre em 4 a 12 dias, dependendo do clima (Oliveira et al., 2001; Lemos et al., 2006). As ninfas recém-eclodidas são claras e também achatadas, mas, em pouco tempo, tornam-se escuras. No primeiro ínstar são bastante ativas, com seis pernas, movem-se por um curto período de tempo e, depois, inserem as peças bucais nas folhas e começa, então, a sugar a seiva elaborada. O quarto e último instar é denominado pupário, que é brilhante e circundado por secreção cerosa branca, com grandes cerdas dorsais (Barbosa & Paranhos, 2004). O adulto é preto, com tons cinza-azulados; a fêmea mede 1,24 mm e o macho 0,99 mm de comprimento (Nguyen & Hamon, 1993). O ciclo biológico, em condições naturais, varia de 54 a 103 dias, com quatro gerações ao ano (Martinez, 1983). A fecundidade e a sobrevivência de *A. woglumi* estão diretamente relacionadas com a planta hospedeira e seu desenvolvimento é favorecido por temperaturas entre 28° e 32°C e umidade relativa do ar elevada, entre 70% e 80% (Barbosa & Paranhos, 2004).

O inseto é capaz de voar até 187 metros em 24 horas. A disseminação da praga pode também ocorrer por meio de folhas infestadas, carregadas pelo vento (Barbosa & Paranhos, 2004).

Trabalhos recentes foram desenvolvidos pela agrônoma Márcia Reis Pena, na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em parceria com a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da USP, avaliando o ciclo de

desenvolvimento de *A. woglumi* e o uso do fungo *Aschersonia* sp., tendo sido obtidos bons resultados quanto ao controle da mosca-negra em condições de laboratório (Agência USP, 2008).

2.5.2 *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889)

Estimam-se, na família Aleyrodidae, mais de 1.200 espécies descritas, sendo 37 reconhecidas como pertencentes ao gênero *Bemisia* (Mound & Halsey, 1978, citados por Byrne & Bellows Jr., 1991).

Em geral, atingiam pequenas populações, até o início da década de 1970, quando ocorreram níveis alarmantes destes insetos no norte do Paraná e sul de São Paulo, devido, principalmente, ao aumento do plantio de soja, que também é hospedeiro para este inseto (Gallo et al., 2002).

Atualmente, *B. tabaci* (Gennadius) é um complexo com vários biótipos e tem como hospedeiros diferentes espécies de plantas de importância econômica, plantas ornamentais e plantas daninhas (Brown et al., 1995). Entre elas, merece destaque *B. tabaci* (Gennadius) biótipo "B", por ser cosmopolita e polífaga, traduzindo-se em sério problema para uma vasta gama de culturas de importância econômica e ornamental, tanto pelos danos causados de forma direta, por meio da sucção de seiva, quanto pela transmissão de geminivírus (Caballero, 1993). Além disso, é altamente resistente aos inseticidas tradicionalmente utilizados no controle de moscas brancas, sendo responsável por prejuízos que giram em torno de alguns bilhões de dólares/ano, bem como por índices de desemprego no campo superiores a 30%. É considerada uma das principais pragas do século XX (Ferreira & Ávidos, 1998).

A importância de *B. tabaci* tem aumentado e isso tem sido associado à introdução e dispersão do biótipo "B", em vários países das Américas e da Europa. O biótipo "B" diferencia-se do biótipo "A" por apresentar maior fecundidade, maior número de hospedeiros, resistência a vários inseticidas e

capacidade de induzir anomalias fisiológicas às plantas, tais como o prateamento das folhas de cucurbitáceas e o amadurecimento irregular de frutos do tomateiro, que são anomalias não causadas por nenhum outro biótipo (Brown et al., 1995).

A primeira constatação da mosca branca, *B. tabaci* biótipo B (= *Bemisia argentifolii*), no Brasil, foi feita no estado de São Paulo, no início dos anos 1990. Naquela ocasião, surtos populacionais do inseto foram observados em plantas ornamentais, principalmente poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) e crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) e em lavouras de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e de abóbora (*Cucurbita moschata*), causando as anomalias conhecidas como amadurecimento irregular dos frutos do tomateiro e folha prateada da abóbora (Lourenção & Nagai, 1994).

No verão de 1997/98, surtos populacionais de *B. tabaci* biótipo B foram observados no norte do estado de São Paulo, nos municípios de Guaiúba e Miguelópolis, importante pólo agrícola com agricultura diversificada e irrigada e uma das poucas áreas paulistas onde ainda não haviam sido observadas infestações do inseto.

As moscas-brancas, ao se alimentarem no floema, causam danos diretos e indiretos às plantas. Como dano direto ocorre a sucção de seiva, que influencia no desenvolvimento da planta, afetando seu crescimento, sua capacidade de produção e a qualidade do produto final, sejam frutos ou folhagens. Outro dano importante é a produção do *honeydew* que, ao se depositar sobre as folhas e frutos, serve como substrato para o desenvolvimento de fungos de coloração preta do gênero *Capnodium*, que formam a fumagina e encobre as partes verdes da planta, diminuindo a área fotossintética e a qualidade dos frutos (Norman et al., 1996).

São insetos pequenos, de 1mm de comprimento, que apresentam seus dois pares de asas cobertos por uma pulverulência branca. Os ovos são colocados nas faces inferiores das plantas, dos quais eclodem ninfas, que já iniciam a sucção

foliar, movimentando-se apenas no início, fixando-se de maneira semelhante às cochonilhas. O ciclo completo dura cerca de 15 dias, sendo a longevidade das fêmeas algo em torno de 18 dias. O biótipo “B” deste inseto pode colocar, em média, 300 ovos/dia (Gallo et al., 2002).

Existem, atualmente, cerca de 70 vírus transmitidos pela mosca-branca em todo o mundo, em diferentes culturas e plantas invasoras, segundo Gerling (1996). O inseto tem alta capacidade de adaptação em relação a mudanças climáticas e se multiplica em grande número de hospedeiros. Assim, esta combinação de características possibilita a distribuição nas principais culturas economicamente importantes no mundo. A interação vírus-vetor é o aspecto principal de disseminação da praga e a contaminação do inseto se dá pela picada e a sucção de seiva em uma planta por, no mínimo, 60 minutos, seguidas de um período de adaptação do vírus no inseto por cerca de 5 horas, para que, então, o inseto inicie a transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Foi utilizado um isolado de *Aschersonia* sp., obtido sobre cadáver de *A. woglumi*, proveniente da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal no Amazonas (UFAM).

Para a obtenção do extrato de substâncias cuticulares foram utilizados imaturos de *Galleria mellonella* (L., 1758) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) e de *Tenebrio* sp. desidratados em estufa, a 80°C, por cerca de duas horas. Após a secagem, os insetos foram triturados e adicionados à água destilada, numa concentração de 10% sobre o volume, que foi posteriormente fervida, em forno de microondas, por 8 minutos (Neves, 1991, adaptado). Após a fervura, foram adicionados os ingredientes que compõem cada meio de cultura, seguindo-se a esterilização em autoclave, durante 20 minutos, a 121°C, para posterior utilização nos bioensaios.

O fungo foi inoculado, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em cinco placas com meio BDA (batata-dextrose-ágar), sendo incubado em câmara BOD (26±1°C, 14 horas de fotofase) por um período de 10 dias. Após esse período, os fungos foram raspados do meio de cultura com a utilização de uma pequena espátula, a fim de se obter inóculo em quantidade necessária para os experimentos.

Nos bioensaios, foram utilizados insetos adultos de *B. tabaci* biótipo “B”, criados em vasos com uma planta de couve, *Brassica oleracea* (L., 1758), em casa de vegetação do Departamento de Entomologia da UFLA.

3.2 Inoculação dos isolados nos meios de cultura

O fungo produzido previamente foi inoculado em placas de Petri contendo os meios observados na Tabela 1, cujas composições se encontram no Anexo. Cada um deles foi considerado um tratamento e, para cada um, foram preparadas 8 placas. As placas foram acondicionadas em câmara BOD ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase) por um período de 12 dias. Após o décimo segundo dia, o fungo que estava se desenvolvendo sobre o meio de cultura foi raspado e armazenado em tubos Eppendorfs para posterior montagem dos experimentos.

TABELA 1 Tratamentos utilizados nos experimentos e suas respectivas siglas

Meio de cultura	Sigla
Meio para esporulação	ME
Sabouraud maltose ágar com extrato de levedura	SMAY
Sabouraud dextrose ágar com extrato de levedura	SDAY
Batata-dextrose-ágar	BDA
Batata-dextrose-ágar + extrato de <i>Galleria mellonella</i> (10%)	BDAGm
Batata-dextrose-ágar + extrato de <i>Tenebrio</i> sp. (10%)	BDAT

3.3 Bioensaios

3.3.1 Viabilidade dos conídios

Após a produção do fungo *Aschersonia* sp. nos diferentes meios de cultura, o mesmo foi raspado, com o auxílio de uma espátula e a concentração de conídios determinada sob microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Foram preparadas suspensões padronizadas em 10^7 conídios/mL, em água destilada mais espalhante adesivo (Tween) 0,01%. Foram espalhados 100 μL desta suspensão, com auxílio da alça de Drigalski, em cinco placas de Petri, contendo uma fina camada de meio ágar-água (AA), para cada um dos inóculos provenientes de diferentes meios de cultura. Essas placas foram acondicionadas em câmara BOD ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase), por 24 horas (Alves, 1998).

Após o período de incubação, os conídios foram observados diretamente sob microscópio óptico, sendo contados pelo menos 450 conídios em cada uma das placas inoculadas, distinguindo-os entre germinados e não germinados. O procedimento foi repetido três vezes e os dados expressos em percentual de conídios germinados.

3.3.2 Crescimento radial das colônias

Os conídios foram inoculados em três pontos, distintos e equidistantes entre si, na superfície dos meios em estudo, em oito placas de Petri, utilizando-se de agulha de platina estéril. Estas placas foram posteriormente acondicionadas em BOD ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase), durante 12 dias. Após esse período, foi avaliado o crescimento radial das colônias, por meio de duas medições perpendiculares, resultando num diâmetro médio.

3.3.3 Conidiogênese

Para avaliar a produção de conídios nos diferentes meios de cultura, as colônias que tiveram seu diâmetro mensurado foram coletadas com auxílio de um estilete e colocadas em tubos de fundo chato contendo 10 mL de água destilada com espalhante adesivo (Tween 80) 0,01%. Os conídios foram desprendidos por meio de agitação em vórtex e, posteriormente, realizadas diluições sucessivas para a contagem e a quantificação em câmara de Neubauer. Os dados foram expressos em número de conídios por colônia (Alves, 1998).

3.3.4 Virulência sobre *Bemisia tabaci*

Para este bioensaio foram utilizados apenas três meios (BDA, BDAGm e BDAT), pois, após a análise da produção de conídios em todos os meios, foram descartados meios que, aparentemente, seriam boas soluções para a produção massal de *Aschersonia* sp., como, por exemplo, os meios SMAY e SDAY, que

apresentaram bons valores de crescimento radial, mas que, por outro lado, obtiveram produção quase que insignificante de conídios.

Foram preparadas suspensões com o fungo produzido nos três meios citados acima, utilizando-se água destilada mais espalhante adesivo (Tween80) 0,01%. Após a determinação da concentração de conídios sob microscópio óptico, com auxílio de uma câmara de Neubauer, foram preparadas suspensões com concentração padronizada em 10^8 conídios/mL, acrescentando-se água destilada mais espalhante adesivo.

Em 10 placas de Petri de 18 cm de diâmetro, para cada meio de cultura, foram colocadas folhas de couve aderidas ao meio AA, sobre as quais cerca de 50 adultos de *B. tabaci* foram dispostos.

Sobre os adultos, utilizando um pulverizador manual e duas bombas a vácuo, do tipo de aquário, ligadas em série, foi aplicado 1 ml da suspensão fúngica. Para a testemunha, o mesmo procedimento foi realizado, aplicando-se água destilada mais espalhante adesivo (Tween80) 0,01%.

Após a inoculação, as placas foram acondicionadas em câmara BOD ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase), por um período de 12 dias, sendo as avaliações realizadas diariamente.

Os insetos mortos foram, então, lavados em álcool 70% e, depois, em água destilada e transferidos para uma câmara úmida (placa de Petri, com 7cm de diâmetro, com papel-filtro levemente umedecido), que foi colocada em um pote plástico fechado contendo espuma umedecida com água destilada no seu interior. Estes potes foram, então, incubados em câmara BOD ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14 horas de fotofase) por até 12 dias, para confirmar o agente causal de mortalidade, por meio da conidiogênese.

3.3.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos analisados estatisticamente, quanto à variância (teste F) e as médias comparadas entre si (teste de Scott-Knott), com 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade dos conídios

Diferenças significativas foram constatadas na viabilidade de conídios, no qual foram observados dois grupos. No primeiro, apresentam-se os fungos produzidos em meio SMAY e SDAY, com baixa viabilidade e, no segundo grupo, encontram-se ME, BDA, BDAGm e BDAT (Tabela 2).

TABELA 2: Viabilidade de conídios de *Aschersonia* sp. produzidos em diferentes meios de cultura após incubação por 24 horas em BOD (temperatura $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Meios de cultura	Viabilidade (%) ^{1, 2}
SMAY	64,2 \pm 4,4a
SDAY	65,6 \pm 4,1a
ME	76,3 \pm 6,7b
BDA	78,4 \pm 7,4b
BDAGm	78,7 \pm 6,5b
BDAT	83,3 \pm 7,6b

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

² $\bar{X} \pm EP(\bar{X})$

Embora Alves (1998) tenha mencionado que a germinação pode ser influenciada pela presença de nutrientes, como aminoácidos, esteróis e hexoses, entre outros, foi testada a viabilidade do fungo sobre a superfície de um meio de cultura sem qualquer adição desses compostos.

Outros nutrientes podem ser acrescentados aos meios de cultivo com o objetivo de incrementar o crescimento e a conidiogênese dos fungos. O extrato de levedura é bastante utilizado, por ser excelente fonte de vitaminas do complexo B, de nitrogênio e de aminoácidos, entre outros (Wenzel et al., 2007). Estes mesmos autores verificaram que a suplementação do meio com extrato de levedura promove o crescimento e a conidiogênese de alguns isolados do fungo *L. lecani*.

Nesse sentido, Boucias et al. (1988), estudando processos iniciais sobre a infecção de fungos entomopatogênicos, reportaram que conídios podem ter atividades enzimáticas diversas, especialmente sobre carboidratos e proteínas. A síntese e a secreção de tais enzimas dependem dos mecanismos de indução/repressão gênicos, altamente influenciados pelo meio de cultura em que os mesmos se encontram.

Hallsworth & Magan (1995), testando isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok, *B. bassiana* e *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith, constataram que o crescimento do tubo germinativo ocorreu mais rapidamente nos conídios que possuíam altas concentrações intracelulares de glicerol e eritritol; visto que as concentrações intracelulares desses componentes são determinadas pelo meio de cultura do fungo, foi possível a correlação do meio de cultura utilizado com a viabilidade dos conídios pelos autores.

Resultados contraditórios são freqüentemente publicados acerca da fase de germinação de conídios. Algumas espécies são capazes de germinar utilizando somente seus próprios nutrientes, enquanto outras necessitam de um suplemento nutricional exógeno. Isso demonstra a necessidade de serem realizados outros experimentos visando constatar a correlação direta entre componentes cuticulares e a viabilidade de conídios, visto que todos os isolados foram mantidos nas mesmas condições (temperatura, fotofase, período de

incubação e umidade), desconsiderando, portanto, a interferência de algum fator ambiental sobre tais dados obtidos.

Mansilla & Alvarez (2005a) observaram porcentagens de conídios viáveis de acordo com o meio no qual o fungo fora produzido, sendo o fungo produzido em grãos de arroz o único a atingir viabilidade superior a 90%. Para os outros meios utilizados, arroz + resíduos de soja, farinha de milho + resíduos de soja e trigo moído, os resultados observados foram de 89%, 88% e 69%, respectivamente.

4.2 Crescimento radial de colônias

Verificou-se que os meios de cultura testados são fatores determinantes no perfil de crescimento do fungo *Aschersonia* sp., visto que a adição de certos componentes ao meio de cultura aumenta significativamente o diâmetro das colônias.

Comparando-se os meios de cultura, aquele no qual o fungo apresentou o maior crescimento radial, após 12 dias de incubação em câmara BOD ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 14 horas de fotofase), foi o meio BDAT, seguido pelos meios SMAY, SDAY e BDAGm, mas que não apresentaram diferenças entre si. O diâmetro das colônias de fungos produzidas em meio ME atingiu valores inferiores. Entretanto, o menor valor quanto ao diâmetro médio de colônias foi obtido a partir da produção em BDA (Tabela 3).

Fungos que possuem maior e mais rápido crescimento são vantajosos no controle biológico, pois a infecção do hospedeiro torna-se mais rápida e efetiva e maior crescimento das hifas acarreta maior formação de metabólitos secundários pelo fungo, dentre os quais as toxinas. Além disso, possibilita a produção em larga escala, visando à obtenção de um produto comercial.

TABELA 3: Crescimento radial de colônias do fungo *Aschersonia* sp. produzido em diferentes meios de cultura, após 10 dias de incubação em BOD (temperatura $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 14 horas de fotofase).

Meios de cultura	Diâmetro médio (mm) ^{1,2}
BDA	9,9 \pm 1,3a
ME	11,0 \pm 1,3b
BDAGm	11,9 \pm 1,0c
SDAY	11,9 \pm 1,7c
SMAY	12,5 \pm 1,0c
BDAT	13,8 \pm 0,6d

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

² $\bar{X} \pm EP(\bar{X})$

Mansilla & Alvarez (2005b) produziram o fungo *A. aleyrodis* em diferentes meios BDA e SDAY e observaram valores de crescimento radial equivalentes a 9-16 e 9-15 mm, respectivamente, que foram maiores em relação ao valor obtido em ME, com crescimento radial de 5-9 mm. Estes resultados diferem dos encontrados no presente trabalho, uma vez que o fungo produzido em meio BDA atingiu valores menores que aquele produzido em ME ou SDAY.

4.3 Conidiogênese

Os meios de cultura SMAY e SDAY produziram, por colônia, valores inferiores a 10^6 conídios (Tabela 4), seguidos pela produção das colônias de *Aschersonia* sp. cultivadas em meio ME. O fungo cultivado em meio BDA e meio BDAGm atingiu valores maiores, mas que não diferiram entre si. As colônias com maior produção de conídios foram observadas quando o fungo foi produzido em meio BDAT.

O aumento na conidiogênese do fungo *Aschersonia* sp. pode estar relacionado com o aumento das fontes de nutrientes proporcionado pela adição de *Tenebrio* sp. ou *G. mellonella* desidratados ao meio de cultura.

TABELA 4: Número de conídios do fungo *Aschersonia aleyrodis* por unidade de colônia, após 10 dias de incubação em BOD (temperatura 26±1°C, fotoperíodo 14 horas), em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Conídios/colônia (10 ⁶) ^{1,2}
SDAY	0,22±0,13a
SMAY	0,38±0,09a
ME	2,20±0,39b
BDA	3,47±0,76c
BDAGm	4,10±0,96c
BDAT	4,80±1,43d

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

² $\bar{X} \pm EP(\bar{X})$

Resultados obtidos por Santoro et al. (2005) indicaram que a presença de farinha de crisálida do bicho-da-seda, tanto sozinha quanto combinada ao meio BDA, aumentou a conidiogênese de *B. bassiana*. Resultados semelhantes foram encontrados por Neves (1991), ao adicionar o mesmo composto à batata, para o fungo *Nomuraea rileyi* Farlow.

Ao contrário do presente trabalho, Neves (1991) relatou melhor conidiogênese para o meios SMAY, usando como justificativa a diferença que existe entre as várias etapas de crescimento. Para o fungo produzido em meio SMAY, a fase que antecede a formação de esporos dura mais tempo que quando produzida em outros meios, como o BDA.

Mansilla & Alvarez (2005a) também constataram diferentes valores de produção de conídios quando o fungo *A. aleyrodis* foi produzido em diferentes meios de cultura, tais como SDAY, BDA e ME, observando valores iguais a 10^8 , 10^8 e 10^5 conídios/ml, respectivamente. Estes resultados diferem do presente trabalho, provavelmente devido ao tempo de produção, que foi maior no trabalho de Mansilla & Alvarez (2005a), pois, como mencionado por Neves (1991), há diferenças entre as etapas de crescimento. O fungo produzido em meio SDAY leva mais tempo para começar a conidiogênese.

Os meios SMAY e SDAY, devido à presença de extrato de levedura e da peptona, são ricos em nitrogênio, semelhante ao meio ME. Entretanto, este não parece ser um componente essencial para a conidiogênese ou, até mesmo, prejudica este processo para o fungo *Aschersonia* sp., necessitando de mais pesquisas para esta comprovação.

Neves (1991) também relatou uma significativa melhora à conidiogênese de *B. bassiana*, quando foram adicionados componentes cuticulares ao meio BDA.

Mansilla & Alvarez (2005b) também observaram diferenças nas concentrações de conídios de *A. aleyrodis*, quando produzidos em diferentes meios de cultura, observando concentrações que variaram entre $1,1 \times 10^6$, quando produzidos em trigo moído e $4,1 \times 10^8$ conídios/mL, quando produzidos em grãos de arroz.

Como os conídios são as unidades infectivas dos fungos entomopatogênicos, a produção rápida e em grandes quantidades de conídios, tanto em meios de cultura artificiais quanto durante o processo de conidiogênese no cadáver, potencializa o uso de determinado isolado em planos de manejo (Liu et al., 2003; Arthurs & Thomas, 2001).

Sosa-Gomez & Alves (2000) ressaltam, em seu trabalho, que a produção de conídios é um evento multifatorial, dependente da umidade relativa, da

temperatura, do isolado, do hospedeiro ou da composição do meio de cultura e do tempo.

Os meios de cultura, devido à sua composição, influenciam no desenvolvimento e na conidiogênese de fungos, de acordo com a necessidade que esses microrganismos têm de fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, ferro, sódio, potássio e outros minerais (Leite et al., 2003).

As diferenças de comportamento no crescimento e na produção de conídios dos fungos estão intimamente ligadas à composição do meio e à capacidade de assimilação dos nutrientes neles encontrados. A esta informação pode-se adicionar o fato de que alguns meios de cultura, considerados compostos, possuem a sua composição química ignorada, como, por exemplo, extratos de carne e levedura (Mayea, 1981, citado por Mansilla & Alvarez, 2005a) e, no caso específico deste trabalho, extrato de *Tenebrio* sp. e *G. mellonella*.

4.4 Virulência

Os três inóculos testados (produzidos em BDA, BDAGm e BDAT) apresentaram atividade patogênica para *B. tabaci*. Os inóculos produzidos em meio BDAT e em BDAGm apresentaram-se mais virulentos que o fungo produzido em BDA sem a adição de qualquer outro componente (Tabela 5).

TABELA 5: Mortalidade confirmada de *Bemisia tabaci* pelo fungo *Aschersonia aleyrodis* produzido em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Mortalidade (%) ^{1,2}
BDA	63,0±4,3a
BDAGm	80,0±6,3b
BDAT	85,6±4,4b

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

² $\bar{X} \pm EP(\bar{X})$

A composição da cutícula de insetos varia de acordo com a espécie e o estágio de vida. Gupta et al. (1992) observaram que a maneira como o fungo desempenha as suas funções está ligada especialmente à regulação da síntese enzimática. Portanto, tais valores relativamente elevados de mortalidade confirmada para os fungos produzidos em meios contendo insetos podem ser atribuídos à regulação da produção enzimática, embora pesquisas mais aprofundadas sejam necessárias para esta confirmação.

Conforme Hajaek & St. Leger (1994), considera-se como parâmetro de seletividade de fungos valores de mortalidade total maior que 60%, possibilitando o seu uso em futuros programas de manejo.

Tais resultados diferem dos obtidos por Neves & Alves (1995), que não observaram diferença significativa quanto à virulência de *N. rileyi* para a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), quando este foi cultivado em meio acrescido de farinha de crisálida de *Bombyx mori* L., 1758 (LEPIDOPTERA: BOMBICIDAE).

Os fungos entomopatogênicos têm sua virulência reduzida após passagens sucessivas por meios de cultura artificiais. Daoust & Roberts (1982) demonstraram o reestabelecimento e, em alguns casos, um aumento da

virulência de isolados de *M. anisopliae*, após passagem por larvas de *Culex pipiens* L., 1758 (DIPTERA: CULICIDAE). Tal aumento permaneceu estável, mesmo após algumas inoculações em meios de cultura artificiais e novos experimentos, sendo semelhante ao aqui observado, após a produção do fungo em meio enriquecido com cutícula do inseto. Além disso, segundo James (2001), uma fonte exógena de nitrogênio estimula um crescimento mais efetivo, favorecendo a virulência do fungo.

5 CONCLUSÕES

- Existe efeito da composição do meio de cultura sobre os aspectos biológicos do fungo *Aschersonia* sp.
- Os inóculos fúngicos avaliados apresentam atividade patogênica para *Bemisia tabaci*.
- A adição de componentes cuticulares de insetos tem influência positiva na virulência de *Aschersonia* sp. sobre *Bemisia tabaci*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *Aschersonia* sp. pode ser considerado um importante agente de controle biológico. Porém, há a necessidade da realização de mais estudos, principalmente quanto a sua produção, pois, embora alguns meios testados nesse trabalho tenham influenciado de maneira positiva a viabilidade, o crescimento, a conidiogênese e a virulência sobre *Bemisia tabaci*, ainda não é possível, utilizando-se dessas formas de produção, realizar o controle biológico de pragas, o que demanda produção em mais larga escala.

Entretanto, os meios BDAGm e BDAT podem ser utilizados como bons pontos de partida para o desenvolvimento de meios alternativos, sejam eles líquidos, sólidos ou bifásicos, dando-se, ainda, preferência para o meio BDAT, que é obtido a partir de extratos de um inseto que é de fácil manutenção em condições de laboratório e pode apresentar custo de produção cerca de cinco vezes menor que o meio BDAGm.

Quanto à manutenção deste fungo em condições de laboratório, os meios BDA e ME são os mais indicados, principalmente devido à facilidade de produção e ao preço relativamente baixo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA MINAS. Ações do IMA previnem ocorrência da mosca negra dos citros. **Notícias do Governo do Estado de Minas Gerais**. 2008. Disponível em: <http://www.agenciaminas.mg.gov.br/detalhe_noticia.php?cod_noticia=18450>. Acesso em: 10 abr. 2008.

AGÊNCIA USP. **Mosca-negra que ataca plantações é alvo de estudo na Esalq**. Universidade de São Paulo: USP, 2008. Disponível em: <<http://www2.usp.br/index.php/ciencias/36-ciencias/360-praga>>. Acesso em: 15 maio 2008.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of Temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 2, p. 59-65, 2001.

AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: _____. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba: Fealq, 1985.

BARBOSA, F. R.; PARANHOS, B. J. Ameaça negra. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, n. 25, 2004. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigo.asp?id=670>>. Acesso em: 26 mar. 2008.

BATISTA, T. F. C.; RODRIGUES, R. C.; OHASHI, O. S.; SANTOS, M. M. L. S.; OLIVEIRA, F. C.; SOARES, A. C.; LIMA, W. G.; CASTRO, C. V. B. Identificação de fungos entomopatogênicos para o controle da mosca-negra-dos-citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Homoptera: Aleyrodidae).

Praga quarentenária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002. Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura. 2002.

BOLCKMANS, G.; STERK, J.; EYAL, J.; SELS, B.; STEPMAN, W. Preferal, (*Paecilomyces fumosoroseus* strain apopka 97), a new microbial insecticide for the biological control of whiteflies in greenhouses. **Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige**, Bélgica, v. 60, p. 707–711, 1995.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1795-1805, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa SDA Nº 38**, de 14 de outubro de 1999. Lista de pragas quarentenárias A1, A2 e as não quarentenárias regulamentadas. Brasília. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/segbio/quarentena/arquivos/instnorm38.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa SDA Nº 59**, de 20 de dezembro de 2007. Lista de Pragas Quarentenárias Presentes – (A2). Brasília. Disponível em: <http://www.jki.bund.de/nn_933804/SharedDocs/07__AG/Publikationen/internat/br/br3-in2007-59.pdf;templateId=raw,property=publicationFile.pdf/br3-in2007-59.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2008.

BROWN, J. K.; FROHLICH, D. R.; ROSSELL, R.C. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 511–534, 1995.

BYRNE, D. N.; BELLOWS Jr., T. S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 431-457, 1991.

CABALLERO, R. Moscas blancas neotropicales (Homoptera: Aleyrodidae): hospedantes, distribución, enemigos naturales e importancia económica. In: HILJE, L.; ARBOLEDA, O.; **Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe**, Turrialba, Costa Rica: CATIE. 1993. p. 10-15. (Série Técnica. Informe Técnico, 205).

CASSINO, P. C. R.; NASCIMENTO, F. N. Aleirodídeos (Homoptera: Aleyrodidae) em plantas cítricas no Brasil: Distribuição e identificação. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 75-83, 1999.

- CHENARKI, A. M.; SOSA-GOMEZ, D. R.; ALMEIDA, L. M.; SOCCOL, C. R. Susceptibilidade de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) a fungos entomopatogênicos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Sincobiol, 7., 2001, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas, MG: UFL/Embrapa, 2001.p. 422.
- CRAWFORD, P. J.; BROOKS, W. M.; ARENDS, J. J. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* as microbial control agents of the lesser mealworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 06, p. 1295-1301, 1998.
- DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 170-117, 1982.
- DOLINSKI, C.; LACEY, L. A. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 161-179, 2007.
- DRUMMOND, J.; HEALE, J. B.; GILLESPIE, A. T. Germination and effects of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Annals of Applied Biology**, v. 111, p. 193-201, 1987.
- EVANS, G. A. **The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the world and their host plants and natural enemies**. USDA/Animal Plant Health Inspection Service (APHIS), 2007. 73p. Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov:591/1WF/World-Whitefly-Catalog.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2008.
- EVANS, H. C.; HYWEL-JONES, N. Aspects of the genera *Hypocrella* and *Aschersonia* as pathogens of coccids and whiteflies. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990, Adelaide. **Proceeding...** Adelaide: Society for Invertebrate Pathology, 1990. p. 111-115.
- FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.22, set./out. 2001.
- FASULO, T. R.; BROOKS, R. F. **Whitefly pests of citrus**. Flórida: University of Florida/ Department of Entomology and Nematology/Florida Department of Agriculture and Consumer Services/Division of Plant Industry, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, L. T.; ÁVIDOS, M.F.D. Mosca branca: presença indesejável no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, MG, v. 4, p. 22-26, 1998.

FIRSTENCEL, H.; BUTT, T. M.; CARRUTHERS, R. I. A fluorescence microscopy method for determining the viability of entomophthoralean fungal spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 258-264, 1990.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. D. B.; MONTEIRO, A. C. Influência de meios de cultura utilizados em teste de viabilidade para isolados de *Verticillium lecanii*. SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Sincobiol, 8., 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro, SP: FIOCRUZ/UFP/UFRRP, 2003.

FRANSEN, J. J. Survival of spores of the entomopathogenic fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes) on leaf surfaces. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 73-75, 1995.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920p.

GERLING, D. Status of *Bemisia tabaci* in the mediterranean countries: opportunities for biological control. **Biological Control**, n. 6, p. 11-22, 1996.

GUPTA, S. C.; LEATHERS T. D.; EL-SAYED G. N.; IGNOFFO C. M. Insects cuticle-degrading enzymes from the entomopathogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v. 16, p. 132-137, 1992.

HAJAEK, A. K.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insects host. **Annual Review of Entomology**, n. 39, p. 293-322, 1994.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, v. 141, p. 1109-1115, 1995.

HEALE J. B.; ISAAC, J. E.; CHANDLER D. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. **Pesticide Science**, v. 26, n. 1, p. 79-92, 1989.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 180-187, 1997.

JAMES, R. R. Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the silverleaf whitefly for two hyphomycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 99-107, 2001.

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

LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; CARDER, J. H.; BURROWS, P. R.; PEBERDY, J. F. Amplification and restriction endonuclease digestion of the pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. **Mycology Research**, v. 101, p. 257-265, 1997.

LECUONA, R.; RIBA, G.; CASSIER, P.; CLEMENT, J. L. Alternation of insects epicuticular hydrocarbon during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 10-18, 1991.

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

LEMOS, R. N. S.; SILVA, G. S.; ARAÚJO, J. R. G.; CHAGASI, E. F.; MOREIRA, A. A.; SOARES, T. M. Ocorrência de *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) no Maranhão. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 558-559, 2006.

LEMOS, W. P.; VELOSO, C. A. C.; RIBEIRO, S. I. **Identificação e controle das principais pragas em pomares de citros no Pará**. 2004. (Comunicado Técnico, 119). Disponível em:
<http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online/comunicado-tecnico/2004/identificacao-e-controle-das-principais-pragas-em-pomares-de-citros-no-para-com-tec-119/at_download>. Acesso em: 26 mar. 2008.

LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIDGE, M.; PARKER, B. L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for

management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 3, p. 139-147, 2003.

LIU, M.; CHAVERRI, P.; HODGE, K. T. A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia aleyrodis*, its allies with white stromata and their *Hypocrella* sexual states. **Mycological Research**, n. 110, p. 537 -554, 2006.

LOURENCAO, A. L.; NAGAI, H.. Outbreaks of Bemisia tabaci in the São Paulo State, Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 53-59, 1994.

MANSILLA, A. A. H.; ÁLVAREZ, C. R. Evaluación preliminar del crecimiento y la esporulación de *Aschersonia aleyrodis* webber en medios de cultivo convencionales. **Fitosanidad**, v. 9, n. 3, p. 61-63, 2005a.

MANSILLA, A. A. H.; ÁLVAREZ, C. R. Medios de cultivo para la reproducción masiva de *Aschersonia aleyrodis* Webber. **Fitosanidad**, v. 9, n. 4, p. 21-28, 2005b.

MARTÍNEZ, N. B. Biología de la mosca prieta de los cítricos *Aleurocanthus woglumi* (homoptera: aleyrodidae) en el campo. **Agronomía Tropical**, v. 31, p. 211-218, 1983.

MEEKES, E. T. M.; VAN VOORST, S.; JOOSTEN, N. N.; FRANSEN, J. J.; VAN LENTEREN, J. C. Persistence of the fungal whitefly pathogen *Aschersonia aleyrodis*, on three different plant species. **Mycology Research**, v. 104, n. 10, p. 1234-1240, Oct. 2000.

MEEKES, E. T. M.; FRANSEN, J. J.; VAN LENTEREN, J. C. Pathogenicity of *aschersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 1, p. 1-11, Sept. 2002.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In: AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998.

MOINO Jr, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V. H. P.; **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2000.

- NARANJO, S. E. Conservation and evaluation of natural enemies in ipm systems for *Bemisia tabaci*. **Crop Prot.**, v. 20, p. 835–852, 2001.
- NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Produção de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em meios à base de farinha de crisálida do bichio-da-seda. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 3, p. 605-612, 1995.
- NEVES, P. M. O. J. **Produção de *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON e *Beauveria basiana* (BALS.) VUILL. utilizando meios de cultura à base de farinha-de-crisálida do bicho-da-seda *Bombyx mori* L., 1758.** 1991. 152p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.
- NGUYEN, R.; HAMON, A. B. Citrus blackfly, *Aleurochantus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae). **Entomology Circular**, Florida: Department of Entomology and Nematology, Division of Plant and Industry, v. 360, p. 1-4, 1993.
- NORMAN, J. W.; RILEY, D. G.; STANSLY, P. A.; ELLSWORTH, P. C.; TOSCANO, N. C. **Management of silverleaf whitefly: a comprehensive manual on the biology, economic impact and control tactics.** Washington: USDA. 1996.
- OLIVEIRA, M. R.V.; HENNEBERRY, T. J.; ANDERSON, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, v. 20, n. 9, p. 709-723, Nov. 2001.
- PORTO, G. Laudo confirma ocorrência de mosca-negra-dos-citros em SP. **Agência Estado**. Disponível em: <<http://www.ae.com.br/institucional/ultimas/2008/mar/24/2468.htm>>. Acesso em: 7 abr. 2008.
- SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J.; SILVA, R. Z.; AKIMI, S.; ZORZETTI, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 313-320, 2005.
- SCHRANK, A.; BASSANESI, M. C.; PINTO, J. R.; COSTA, S.V.; BOGO, M. R.; SILVA, M. S. N. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciências e Cultura**, v. 45, p. 200-205, 1993.

SHIMIZU, S.; TSUCHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**. Amsterdam: Elsevier, v. 61, n. 2, p. 192-195, 1992.

SOSA-GOMEZ, D. R.; ALVES, S. B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 515-521, 2000.

ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 150, p. 413-416, 1988.

St. LEGER, R.J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 253-262, 1989.

WENZEL, I. M.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Performance of *Lecanicillium lecanii* culture media containing vitamins and yeast extract concentrations. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 413-421, 2007.

ANEXOS

Meios de cultura

Os meios de cultura foram produzidos com base na composição descrita por Alves et al. (1998).

Batata-dextrose-ágar (BDA)

Batata para a extração de amido-----	200g
Dextrose -----	20g
Ágar -----	15g
Água destilada (q.s.p.) -----	1000mL

As batatas foram picadas e cozidas em água destilada e, posteriormente, filtradas. Ao filtrado foram adicionados os componentes restantes do meio, que foi esterilizado, a 121°C, por 20 minutos.

Sabouraud dextrose ágar com extrato de levedura – modificado (SDAY)

Peptona bacteriológica -----	10g
Dextrose -----	40g
Extrato de levedura-----	10g
Ágar -----	15g
Água destilada (q.s.p.) -----	1000mL

Sabouraud maltose ágar com extrato de levedura – modificado (SMAY)

Peptona bacteriológica -----	10g
Maltose -----	40g
Extrato de levedura -----	2g
Ágar -----	15g
Água destilada (q.s.p.) -----	1000mL

Meio sólido para a produção de esporos sólido - ME

NaNO ₃ -----	1,58g
KH ₂ PO ₄ -----	0,36g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O -----	0,6g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O -----	1,05g
KCl -----	1,0g
Dextrose -----	10g
Ágar -----	20g
Extrato de levedura -----	5g
Água destilada -----	1000mL

Após o preparo, o meio foi esterilizado em autoclave, por 20 minutos, a 121°C.

Meio sólido para a produção de esporos, acrescido de cutícula 10%

Foram preparados 900mL de BDA, adicionando-se 100mL do caldo formado após a fervura do extrato de cutícula em água, seguido de esterilização, por 20 minutos, a 121°C.