

VIRGÍNIA MICHELLE SVEDESE

**SUSCETIBILIDADE DE *ZAPRIONUS INDIANUS*
(DIPTERA:DROSOPHILIDAE) AO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *BEAUVERIA BASSIANA***

**RECIFE
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**SUSCETIBILIDADE DE *ZAPRIONUS INDIANUS*
(DIPTERA: DROSOPHILIDAE) AO FUNGO
ENTOMOPATOGENICO *BEAUVERIA BASSIANA***

RECIFE

2007

VIRGÍNIA MICHELLE SVEDESE

**SUSCETIBILIDADE DE *ZAPRIONUS INDIANUS* (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE) AO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
*BEAUVERIA BASSIANA***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia de Fungos, da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Biologia de Fungos.

MESTRANDA: Virgínia Michelle Svedese

ORIENTADORA: Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADOR: Tânia Rieger

RECIFE

2007

Svedese, Virgínia Michelle

Suscetibilidade de *Zaprionus indianus* (Díptera: *Drosophilidae*) ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*./ Virgínia Michelle Svedese. – Recife: A Autora, 2007.

55 fls. .: il.

**Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – UFPE.
CCB**

1. Fungos 2. Micologia 3. Controle biológico 4. Beauveria bassiana 4. Fungo Entomopatológico I. Título

**582.28
579**

**CDU (2ª. Ed.)
CDD (22ª. Ed.)**

**UFPE
CCB – 2007 – 175**

VIRGÍNIA MICHELLE SVEDESE

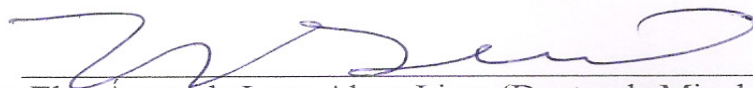
**SUSCETIBILIDADE DE *ZAPRIONUS INDIANUS*
(DIPTERA: DROSOPHILIDAE) AO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *BEAUVERIA BASSIANA***

ORIENTADORA: Prof^ª Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADORA: Tânia Tassinari Rieger

BANCA EXAMINADORA

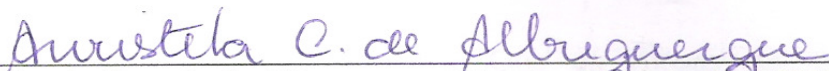
TITULARES:



Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (Depto. de Micologia/ UFPE)



Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Depto. de Micologia/ UFPE)



Dra. Auristela Correia de Albuquerque (Depto. de Biologia/ UFRPE)

SUPLENTES:

Dra. Janete Magali de Araújo (Depto. de Antibióticos/ UFPE)

Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (Depto. de Micologia/ UFPE)

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

A minha mãe e ao meu pai Mário, dedico.

AGRADECIMENTOS

Sincero agradecimento a Deus, por estar sempre ao meu lado e assim permitir que eu vencesse mais esta etapa.

Aos meus pais, Mário e Carlos e a minha mãe, Virgínia pelo apoio, confiança, incentivo e carinho durante toda minha formação.

À minha família pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

À minha orientadora Prof^a Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pelo companheirismo, paciência, aprendizado e amizade depositados em mim.

Aos professores Auristela Albuquerque, José Ferreira e Tânia Rieger pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu namorado Paulo e as minhas amigas Manoela e Elaine pelas ajudas cedidas, companheirismo, paciência e apoio nos momentos difíceis.

As minhas amigas de laboratório, Ana Almeida e Rosineide, pelo companheirismo e amizade ao longo dessa longa caminhada, sendo pra mim sempre um porto seguro. Sem deixar de mencionar as grandes ajudas dadas na execução desta pesquisa. Muito obrigada!

Aos colegas de laboratório, Prof^a Laura, Ana Paula Duarte, Antônio, Daisi, Emily, Guaraná e Mariele pela convivência harmoniosa.

A Nara e Sérgio, do Departamento de Genética, pela ajuda e paciência durante todo o decorrer deste trabalho.

Aos meus colegas de turma, pelos momentos agradáveis e por fazerem desta, mais uma etapa inesquecível em minha vida. Em especial, a Flávia, pelo carinho e amizade e a Inaldo Ferreira pela ajuda na obtenção das fotos.

Ao Dr. Venézio (IPA) e ao Dr. Francisco Júnior pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao CNPq e ao BNB pelo suporte financeiro e técnico-científico no andamento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Aspectos taxonômicos e biológicos de <i>Beauveria bassiana</i>	03
2.2 Potencial de <i>Beauveria bassiana</i> no controle biológico	06
2.3 Patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> contra Dipteros	09
2.4 Aspectos biológicos e ecológicos de <i>Zaprionus indianus</i>	11
2.5 Ocorrência de <i>Zaprionus indianus</i>	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local de realização do experimento	17
3.2 Linhagens de <i>Beauveria bassiana</i>	17
3.3 Meios de cultura e Soluções utilizadas.....	17
3.4 Obtenção e manutenção da colônia de <i>Zaprionus indianus</i>	18
3.5 Produção de conídios no arroz	18
3.6 Quantificação do inóculo	18
3.7 Bioensaios	18
3.7.1 Bioensaio com larvas de <i>Zaprionus indianus</i>	19
3.7.2 Bioensaio com adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	19
3.7.3 Esporulação de <i>Beauveria bassiana</i> em cadáver de <i>Zaprionus indianus</i>	19
3.7.4 Reisolamento do fungo após colonização sobre <i>Zaprionus indianus</i>	20
3.8 Viabilidade dos conídios	20

3.9 Cultura em lamínula	20
3.10 Mensuração do crescimento colonial	21
3.11 Análise estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Parâmetros biológicos de larvas de <i>Zaprionus indianus</i>	22
4.2 Parâmetros biológicos de adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	26
4.3 Parâmetros biológicos das linhagens antes e após passagem pelo inseto.....	34
4.3.1 Aspecto e crescimento da colônia fúngica	34
4.3.2 Análise microscópica	36
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Zaprionus indianus</i> , adaptado	12
Figura 2. Figs infestados por larvas de <i>Zaprionus indianus</i>	16
Figura 3. Ritmo de emergência de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , a partir de larvas infectadas com <i>Beauveria bassiana</i> URM2916.....	24
Figura 4. Ritmo de emergência de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , a partir de larvas infectadas com <i>Beauveria bassiana</i> URM3447.....	24
Figura 5. Percentual da mortalidade média de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> infectados com <i>Beauveria bassiana</i> URM3447, ao longo do tempo.....	32
Figura 6. Diferentes fases de desenvolvimento de <i>Zaprionus indianus</i> , infectados por <i>Beauveria bassiana</i> . A (larva), B (pupa) e C (adulto).....	33
Figura 7. Crescimento radial de <i>Beauveria bassiana</i> URM2916 (padrão), após 15 dias em BDA.....	35
Figura 8. Estruturas leveduriformes de <i>Beauveria bassiana</i> URM2916, após 48 horas em BDA.....	37
Figura 9. Conidióforos de <i>Beauveria bassiana</i> URM2916, após 120 horas em BDA.....	37
Figura 10. Conidióforo jovem de <i>Beauveria bassiana</i> URM3447, após 48 horas em BDA.....	38
Figura 11. Anastomoses de <i>Beauveria bassiana</i> UR3447, após 72 horas em BDA.....	38

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas no experimento.....	17
Tabela 2. Período médio (dias) de pré-pupa e estágio pupal de <i>Zaprionus indianus</i> , a partir de larvas infectadas com <i>Beauveria bassiana</i> (URM2916 e URM3447).....	23
Tabela 3. Percentual de emergência de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> após 14 dias de exposição das larvas a <i>Beauveria bassiana</i>	26
Tabela 4. Percentagem média de mortalidade acumulada de <i>Zaprionus indianus</i> em diferentes dias após infecção por <i>Beauveria bassiana</i>	27
Tabela 5. Percentual de mortalidade de <i>Zaprionus indianus</i> após 12 dias de exposição de adultos a <i>Beauveria bassiana</i>	28
Tabela 6. Concentração Letal (CL ₅₀) das linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	29
Tabela 7. Tempo Letal (TL ₅₀) das linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	31
Tabela 8. Produção de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> URM2916 e <i>Beauveria bassiana</i> URM3447 sobre cadáveres de <i>Zaprionus indianus</i> (x 10 ⁷ conídio/mL)	34
Tabela 9. Crescimento radial (cm) das linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> padrão e reisolada de <i>Zaprionus indianus</i>	36

**SUSCETIBILIDADE DE *Zaprionus indianus* (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE) AO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria
bassiana***

RESUMO

Zaprionus indianus é conhecida como a mosca do figo. Vem se disseminando por todo Brasil, devido às condições ambientais favoráveis. Por ser recém-introduzida não há medidas eficazes para seu controle. Uma alternativa viável poderá ser o uso de fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*. Este trabalho foi conduzido em condições de laboratório, para avaliar a suscetibilidade de *Z. indianus* à *B. bassiana*. As larvas foram submersas e os adultos foram pulverizados com diferentes concentrações fúngicas (10^4 a 10^8 conídios/mL) e em seguida colocados em recipiente contendo meio específico, para análise dos parâmetros biológicos. O período de pré-pupa não sofreu alteração em relação ao grupo controle, já o estágio pupal foi aumentado em três dias. O percentual de emergência no grupo controle foi de 97,33%, enquanto na maior concentração (10^8) foi de 10,60 e de 13,33% para *B. bassiana* URM2916 e *B. bassiana* URM3447, respectivamente. No bioensaio com adultos foi observada morte a partir do 2º dias após a inoculação. O percentual de mortalidade variou de 37,00% a 98,66%. Os valores da CL_{50} foram de $1,09 \times 10^5$ e de $3,8 \times 10^6$ conídios/mL, e os do TL_{50} variaram de 5,3 e 7 dias. O fungo reisolado de *Z. indianus* não apresentou diferenças morfológicas, contudo o seu desenvolvimento foi acelerado. Os dados demonstraram que *B. bassiana* URM2916 foi a mais eficiente, contudo as duas linhagens analisadas foram potencialmente patogênicas à *Z. indianus* e mostraram ser promissores agentes biocontroladores.

Palavras-chaves: *Zaprionus indianus*, *Beauveria bassiana*, Fungos Entomopatogênicos, Controle Biológico.

**SUSCEPTIBILITY OF *Zaprionus indianus* (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE) TO THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS
*Beauveria bassiana***

ABSTRACT

Zaprionus indianus is known as “fig fly”. It comes disseminating in whole Brazil, due to the environmental favorable conditions. It was introduced recently and there isn't measured efficient for its control. A viable alternative could be used is the entomopathogenic fungi, like *Beauveria bassiana*. The present study was developed in laboratory conditions to evaluate the susceptibility of *Z. indianus* to *B. bassiana*. The larvae were submerged and the adults were pulverized by different fungic concentration (10^4 to 10^8 conidia/mL) and stored in container containing specific medium in order to analyze the biological parameters. The pre-pupal period was not altered in comparison with the control group; the pupal stage was increased in three days. The percentage of emergence in the control group was 97.33 %, while in the higher concentration (10^8) it was 10.60 and 13.33 % for *B. bassiana* URM2916 and *B. bassiana* URM3447, respectively. In the adult's bioassay it was observed death from the second day after inoculation. The mortality percentage varied from 37.00 % to 98.66 %. The values of LC_{50} were of 1.09×10^5 and of 3.8×10^6 conidia/mL, and those of LT_{50} varied from 5.3 to 7 days. The re-isolated fungus of *Z. indianus* did not show morphological alterations, however the development of the fungus was improved. The data showed that *B. bassiana* URM2916 was more efficient; however two analyzed strains were potentially pathogenic to *Z. indianus* and showed be promising biocontroler agents.

Key-words: *Zaprionus indianus*, *Beauveria bassiana*, Entomopathogenic Fungi, Biological Control.

1. INTRODUÇÃO

Zaprionus indianus Gupta, é uma espécie da ordem Diptera pertencente à Família Drosophilidae. As espécies desta família caracterizam-se por medirem na fase adulta de 1,5 a 3,0 mm de comprimento e por se criarem geralmente em frutas, ou matéria fermentada (GALLO et al., 2002). A maioria dos drosofilídeos é conhecida por sua importância em estudos genéticos, sendo *Drosophila melanogaster* Meigen, a principal delas, contudo algumas espécies são relatadas como importantes pragas agrícolas (CORONADO & MÁRQUEZ, 1972).

Zaprionus indianus foi registrada pela primeira vez no Continente Americano em frutos de caqui, *Diospyros kaki* Linnaeus apodrecidos, no município de Santa Isabel, em São Paulo (VILELA, 1999). Em março de 1999, esta mosca foi observada atacando frutos do figo em início de amadurecimento, antes da colheita, no município de Valinhos/São Paulo. Em 2000 foi encontrada no Nordeste, na região do Vale do Rio São Francisco em Sobradinho/BA e posteriormente foi encontrada na zona da mata e na zona litorânea de Pernambuco e na Paraíba, demonstrando a alta capacidade de disseminação. Nesta região a mosca está atacando frutos nativos, como, umbu, sirigüela, jaca, sapoti e jenipapo, formando reservatórios naturais de onde podem reinfestar áreas de fruticultura (SANTOS et al., 2003).

A mosca deposita seus ovos no ostíolo do fruto e as larvas penetram no seu interior tornando-o impróprio para o consumo. Desde a sua primeira reportagem tornou-se a praga mais importante deste fruto no Brasil, daí o nome de mosca-do-figo. Na época de sua constatação, chegou a causar cerca de 40% de perdas na produção do figo “in natura” e 80% de redução nas exportações. Por ser recém-introduzida não há medidas eficazes para seu controle, o eventual uso de substâncias químicas poderá implicar em problemas ambientais e também em prejuízos sócio-econômicos, uma vez que vários países impõem rigorosa restrição à importação de frutas com resíduos químicos (VILELA et al., 2001). O uso de inimigos naturais vem se tornando uma excelente e promissora alternativa no controle biológico de pragas.

Os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos fitófagos,

aquáticos e pragas que vivem no solo e de causar epizootias naturais. Têm grande versatilidade e podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros. Dentre os fungos entomopatogênicos considerados mais importantes encontram-se os gêneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, entre outros (ALVES, 1998; ONOFRE et al., 2002).

Beauveria bassiana é comumente encontrado parasitando insetos, ocorrendo em mais de 200 espécies (ALVES, 1998). Deste modo é largamente utilizado no controle de vários insetos pragas, inclusive de moscas (KAAYA, 1989). A eficiência de *B. bassiana* já foi demonstrada por Kaaya & Munyinyi (1995) contra *Glossina morsitans morsitans* Wiedemann, (Diptera) (mosca africana tse-tsé) constatando alta mortalidade sobre as pupas (97%). Ainda Reithinger et al. (1997) estudaram a ação deste fungo contra mosquitos vetores da leishmaniose e verificaram uma redução no tempo de sobrevivência dos insetos infectados.

Diante da importância dos fungos entomopatogênicos, atuando como agentes de controle de insetos-praga, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a suscetibilidade de *Z. indianus* à *B. bassiana*, visando fornecer informações para o controle biológico da mosca-do-figo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS E BIOLÓGICOS DE *Beauveria bassiana*

O gênero *Beauveria* foi estabelecido em homenagem a Beauverie, renomado entomologista francês da época. O fungo foi encontrado causando a doença Muscardine Branca sobre *Bombyx mori* Linnaeus, (Lepidoptera), o bicho da seda. Agostino Bassi foi quem primeiro demonstrou que essa doença era causada por um fungo, como ele não era micologista enviou as culturas para Balsamo-Crivelli, micologista italiano. Este colocou o fungo no gênero *Botrytis* e o nomeou *Botrytis bassiana*. Muitos estudos foram realizados e as características não convenciam os taxonomistas da época, de que se tratava de *Botrytis*. Deste modo em 1912, Vuillemin reestudou o fungo e o nomeou *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin colocando a espécie em sinonímia (BENHAM & MIRANDA, 1953; MACLEOD, 1954). Por outro lado De Hoog (1972) em sua monografia sobre o gênero, considerou somente três espécies: *B. bassiana*, que possui conídios globosos ou subglobosos e conidióforos formando densos cachos; *B. brongniartii* (Saccardo) Petch, apresenta conídios elipsóides e conidióforos escassos, raramente em cachos e *B. alba* (Limber) Saccas com células conidiogênicas dispersas ao longo do eixo do conidióforo.

Clarck et al. (1968) relataram que o ciclo biológico de *B. bassiana* apresenta duas fases distintas: uma parasitária e outra sapróbia. A parasitária se inicia com a penetração tegumentar que ocorre devido à ação mecânica e enzimática. A germinação dos conídios pode ocorrer em qualquer parte da cutícula do inseto; o tubo germinativo penetra através da cutícula, atinge a hemolinfa, diferencia-se em estruturas leveduriformes e conseqüentemente ocorre à morte do inseto; a fase sapróbia ocorre depois que os conidióforos se exteriorizam, formando os conídios que são dispersos pelo ar ou através de outros fatores de dispersão. Com a mesma finalidade, Moino Jr. et al. (2002) observaram o ciclo biológico de *B. bassiana* sobre o cupim subterrâneo, *Heterotermes tenuis* Hagen (Isoptera). Os autores verificaram que após a aplicação, os conídios aderiram à cutícula do inseto entre 0 – 6 horas após a inoculação e a germinação ocorreu entre 12 e 48 horas após a inoculação. Durante o processo de penetração na cutícula do hospedeiro foi observado o alargamento da extremidade do tubo germinativo caracterizando a formação de

apressórios; estas estruturas estão envolvidas com o mecanismo de penetração na cutícula do inseto (Alves, 1998). A fase de colonização ocorreu entre 72 e 120 horas. O inseto morto apresentou coloração rosada, característica da atividade da oosporina que é comum em insetos infectados por este fungo. A extrusão micelial dos cadáveres ocorreu principalmente nas áreas intersegmentais. Esses resultados também foram observados por Neves & Alves (2004), ao estudar o desenvolvimento deste fungo sobre outra espécie de cupim (*Cornitermes cumulans* Kollar, Isoptera).

Ferron (1981) determinou que a temperatura ótima de crescimento de *B. bassiana* corresponde a 25° C. No mesmo sentido, Luz et al. (1999) estudaram a esporulação deste fungo em cadáveres do barbeiro, *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera) após infecção em diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30° C). A esporulação foi significativamente diferente entre os isolados e entre as temperaturas testadas. Na temperatura de 20°C todos os isolados tiveram uma alta esporulação, entretanto apenas *B. bassiana* CG474 apresentou boa esporulação nessas temperaturas. Ainda Devi et al. (2005) avaliaram os efeitos da umidade e da elevada temperatura sobre a germinação e o crescimento de *B. bassiana* e demonstraram que a viabilidade foi afetada quando submetidos à temperatura de 32, 35, 38 e 42° C em relação ao grupo controle (25° C).

Luna-Alves Lima (1989) estudou a conidiogênese de *B. bassiana* e observou que esta segue o modelo simpodial e a condição uninuclear dos conídios, que variaram de tamanho e forma. Ainda no que segue a citologia, Luna-Alves Lima & Tigano (1989) estudaram a formação de estruturas leveduriformes em meios de cultura líquida e submersa e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera). Verificaram que essas estruturas se formaram a partir da germinação dos conídios, 16 horas após a inoculação ou 72 horas após a diferenciação hifal. Mostraram também que *in vitro*, essas estruturas eram uni ou binucleadas e na hemolinfa do inseto eram maiores e multinucleadas.

Ferreira (2000) ao observar o aspecto macroscópico de *B. bassiana*, constatou que a mesma apresentou colônias de cor branca, de aspecto cotonoso e de reverso esbranquiçado. Estudou a esporulação e a viabilidade dos conídios em vários substratos e demonstrou que *B. bassiana* obteve melhor esporulação e maior viabilidade (96,09%) no arroz parboilizado. Marques et al. (2000) verificaram a viabilidade e virulência de conídios de *B. bassiana*, armazenados em *freezer* por longos períodos em baixa temperatura (-7±1°C).

Após 0, 5, 8, 50, 75 e 80 meses de armazenamento, a viabilidade foi avaliada em BDA e a virulência testada sobre larvas da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera). O fungo manteve a viabilidade de 100% em todos os tratamentos e causou elevada mortalidade sobre as larvas, 96, 92, 94, 96 e 94% nos respectivos tempos de armazenamento.

O ciclo das relações fungo-hospedeiro como foi relatado por Alves (1998), depende das condições ambientais como, temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. Sabendo que o ambiente determina o biotipo dos patógenos, é provável que a virulência e agressividade do fungo variem de acordo com a espécie de hospedeiro e da região geográfica considerada. Silva (2001) estudou a ação de *B. bassiana* contra o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, Coleoptera) e verificou variação na virulência entre diferentes hospedeiros e regiões geográficas.

Devido à diversidade intra-específica que dificulta os estudos taxonômicos, tornam-se necessários à caracterização de linhagens dentro da espécie: estudos citológicos, bioquímicos e moleculares, entre outros, para auxiliar na caracterização dessas linhagens, visto que as diferenças citomorfológicas não são suficientes para distingui-las (LUNA-ALVES LIMA & TIGANO, 1989). Essa diversidade é gerada em decorrência do ciclo parassexual, descrito pela primeira vez em *B. bassiana* por Paccola-Meireles & Azevedo (1991), a partir do cruzamento entre mutantes obtidos com o emprego de raios gama. Os produtos analisados foram recombinantes haplóides. Os diplóides não foram observados devido à alta instabilidade genética, ocorrida via parameiose. O ciclo parassexual é uma alternativa de sexo que os fungos anamorfos utilizam para assegurar a diversidade genética e representa a única via para se efetuar os estudos genéticos deste grupo.

2.2 POTENCIAL DE *Beauveria bassiana* NO CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de pragas é uma das formas de manter populações de insetos em equilíbrio no ambiente, limitando a rápida multiplicação destes e sem causar danos a outros organismos. As vantagens de agentes entomopatogênicos em relação aos pesticidas químicos consistem na eficiência, no custo, na segurança do homem, na redução de resíduos tóxicos nos alimentos e na preservação dos inimigos naturais no ecossistema (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Os fungos penetram na cutícula do hospedeiro através de um mecanismo que envolve ação mecânica e enzimática. As principais enzimas envolvidas neste processo são as proteases, lipases e quitinases (ST. LEGER et al., 1992). Diferentemente das bactérias, dos protozoários e dos vírus, os fungos podem infectar os insetos pelo intestino, mas também pelos espiráculos e particularmente pela superfície do tegumento. Essas peculiaridades possibilitam que a infecção destes insetos seja independente de sua atividade alimentar (HAJEK & ST. LEGER, 1994).

B. bassiana é de ocorrência cosmopolita, sendo freqüentemente encontrada tanto sobre os insetos quanto em amostras de solo, onde podem sobreviver por longo tempo em saprogênese. Em condições de laboratório, pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que no campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica em Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera e em ocorrência enzoótica sobre Diptera e Orthoptera. Este fungo tornou-se conhecido internacionalmente pelo produto soviético Boverin, formulação que contém 6×10^9 conídios/g (ALVES, 1998).

Bustillo et al. (2002) efetuaram pesquisa com o objetivo de levantar e registrar os inimigos naturais e competidores da broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, Coleoptera), na região cafeeira colombiana. Apesar da recente introdução da broca do café na Colômbia, foram registrados 25 inimigos naturais, incluindo *B. bassiana*. Esta foi a mais freqüente das cinco espécies fúngicas encontradas, possivelmente os inóculos foram provenientes de outras infecções em insetos que ocorrem naturalmente nas plantações de café e de banana. Com a mesma finalidade, Estrada et al. (2004) determinaram a presença natural de *B. bassiana* em culturas de cana-de-açúcar de várias províncias de Cuba, a partir de *D. saccharalis* que possuíam sintomas de micoses. Foram coletadas 63 amostras do

inseto em folhas e nos talos das plantas obtendo um total de 48 isolamentos e 210 culturas puras de *B. bassiana*. Este fato é importante, pois demonstra que a população de *D. saccharalis* nos canaviais de Cuba pode estar sendo regulada pela presença natural deste fungo. Já Alves et al. (2005) relataram a ocorrência natural de *B. bassiana* sobre larvas e adultos do cascudinho, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera) em aviários comerciais no Brasil. O experimento foi realizado de setembro/2002 a fevereiro/2003, com amostragem semanal de insetos no solo periférico de um aviário comercial em Cascavel, PR. O fungo esteve presente em todas as avaliações, infectando principalmente larvas (49% a 100%, média de 74,4%) e adultos (0,9% a 100%, média de 40,7%) encontrados no solo, sendo que pupas infectadas ocorreram apenas em duas avaliações (33% a 50,0%, média de 6,9%). O isolado de *B. bassiana* obtido nos cadáveres teve sua patogenicidade ao cascudinho, comprovada pelo Postulado de Koch, em condições de laboratório.

Todoivora et al. (2002) avaliaram a suscetibilidade do percevejo predador *Perillus bioculatus* Fabricius (Hemiptera) a seis isolados de *B. bassiana*. Cinco isolados mostraram alta patogenicidade, causando mais que 70% de mortalidade após oito dias, na concentração de 10^6 conídios/mL. Apenas *B. bassiana* IPP46 mostrou baixa patogenicidade, causando apenas 11% de mortalidade. Os efeitos de *B. bassiana* contra várias espécies de Hemiptera foram avaliados como *Triatoma infestans* (LUZ et al., 1998; LUZ et al., 1999), *Rhodnius prolixus* Stal (FARGUES & LUZ, 2000), *Bemisia tabaci* Gennadius (BROWNBIGDE et al., 2001; VICENTINI et al., 2001), *Lygus* spp. (LIU et al., 2003; MACGUIRE et al., 2006), *Podisus nigrispinus* Dallas (FRANÇA et al., 2006) entre outros.

Isolados de *B. bassiana* foram testados sobre lagartas da broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury (Lepidoptera), onde na concentração de 10^8 conídios/mL, a porcentagem de mortalidade provocada variou de 53,3 a 83,3%, com Tempo Letal compreendido entre 8,5 e 14,8 dias (FIGUEIRÊDO et al., 2002). Por outro lado, Tefera & Pringle (2003) investigaram em laboratório os efeitos do método de exposição, concentração conidial e temperatura na infecção, mortalidade e esporulação em cadáveres de 2º instar de *Chilo partellus* Swinhoe, (Lepidoptera) infectados por *B. bassiana*. Larvas diretamente pulverizadas com conídios, expostas a folhas tratadas com conídios e as larvas mergulhadas em suspensão conidial resultaram em alta mortalidade de 98 a 100%.

Wright et al. (2002) avaliaram a transferência de três linhagens de *B. bassiana* entre cupins subterrâneos e a mortalidade subsequente. 10 cupins caminharam sobre a colônia fúngica e em seguida foram transferidos para placas de Petri contendo 10 cupins não expostos ao fungo; duas linhagens causaram em sete dias 100% de mortalidade de todos os cupins (expostos e não expostos) e a outra linhagem provocou esta mortalidade apenas no 21º dia. Já Sun et al. (2003) também examinaram os efeitos da virulência, esporulação e temperatura de *B. bassiana* sobre o cupim subterrâneo. Os isolados deste fungo causaram médias de mortalidade entre 25,8-37,6% a 27° C e de 18,6-24,2% a 35° C; os dados mostraram que a germinação foi diferente nas temperaturas testadas, indicando que houve uma diminuição dessa taxa com o aumento da mesma. Neste sentido Albuquerque (2005) investigou a ação de *B. bassiana* sobre *Nasutitermes coxipoensis* Holmgren, (Isoptera). O percentual de morte acumulada foi de 100% no 4º dia quando utilizado $3,4 \times 10^6$ conídios/ mL e no 5º dia utilizando $3,75 \times 10^5$ conídios/ mL após a inoculação. A produção de conídios sobre os cadáveres do cupim apresentou médias de $35,62$ e $65,66 \times 10^4$ nas duas doses testadas.

Loureiro & Monteiro (2004; 2005) avaliaram a ação de *B. bassiana* sobre *Atta sexdens sexdens* Linnaeus (Hymenoptera). Os autores registraram uma mortalidade de 66,7% sobre operárias e 100% sobre soldados, provocadas por *B. bassiana* AM9, indicando o seu potencial como agente controlador dessa praga.

Neves & Hirose (2005) selecionaram isolados de *B. bassiana* para o controle da broca-do-café (*H. hampei*). A mortalidade entre os isolados variou de 62,7 a 91,3%. Destacando-se entre os mesmos a *B. bassiana* CG425, que apresentou maior mortalidade corrigida e confirmada e maior taxa de esporulação em todas as concentrações. Vários outros autores vêm comprovando a eficiência deste fungo sobre Coleoptera (MOINO JR. et al., 1998; RICE & COGBURN, 1999; SILVA, 2001; ALMEIDA, 2005; CHERRY et al., 2005).

Além de grande sucesso no controle de pragas agrícolas, diversos pesquisadores já demonstraram a eficácia deste fungo no controle de parasitos de animais. A patogenicidade de *B. bassiana* foi avaliada sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari). Esse fungo causou mortalidade no carrapato superior a 90% e aumentou a incubação dos ovos confirmando o potencial do fungo como agente

biocontrolador desse carrapato (BITTENCOURT et al., 1996; ATHAYDE, 2002). Estudos sobre a redução do percentual de eclosão de larvas do carrapato canino, (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille) usando *B. bassiana* e *M. anisopliae* na concentração 10^8 conídios/mL foram feitos apresentando bons resultados (Monteiro et al.1998). Prette et al. (2005) também avaliaram a eficiência de diferentes isolados de *B. bassiana* contra *R. sanguineus*. Os isolados aplicados nas diferentes concentrações de conídios causaram redução no percentual de eclosão de larvas oriunda de ovos infectados (0,7 a 12,1% de eclosão) e no percentual de ecdise de larvas (4,7 a 33,7% de ecdise) e ninfas (0 a 16,7% de ecdise). A patogenicidade de *B.bassiana* foi testada também em carrapatos das espécies *Anocentor nitens* Neumann (CARNEIRO et al., 1999) e *Amblyomma cajennense* Fabricius (REIS et al., 2001), onde provocaram mortalidade ou alterações em algumas fases de seu ciclo biológico.

2.3 PATOGENICIDADE DE *Beauveria bassiana* CONTRA DIPTEROS

Beauveria bassiana tem se mostrado patogênica contra diferentes estágios do desenvolvimento de diversos dípteros. Kaaya (1989) observou a ação de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *P. farinosus* contra adultos da mosca do sono (*Glossina morsitans morsitans*). Foi observado que *B. bassiana* e *M. anisopliae* causaram as maiores médias de mortalidade que variaram de 60 e 95%, ao contrário das outras espécies, que causaram baixa mortalidade. O autor avaliou ainda a suscetibilidade de machos e fêmeas dessa mosca a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, os dados mostraram que a mortalidade dos machos foi significativamente maior do que a das fêmeas, possivelmente devido ao seu reduzido tamanho.

Steinkraus et al. (1990) relataram a primeira ocorrência natural de *B. bassiana* sobre a mosca doméstica (*Musca domestica*, Linnaeus). As observações foram feitas durante 1985 e 1988 em 15 fazendas de Nova York e foram encontradas moscas infectadas em 12 fazendas, com prevalência de infecção de 0,86% em 1985 e de 0,06% em 1988. O fungo reisolado foi utilizado logo após o isolamento (conídios frescos) e os estocados após dois anos, para avaliar *in vitro* a suscetibilidade da mosca doméstica. Os

resultados demonstraram que não houve diferença na infectividade do fungo quanto ao tempo de estocagem dos conídios. Já Watson et al. (1995) avaliaram a eficácia de diferentes formulações (pó e solução aquosa) de *B. bassiana* contra mosca doméstica e contra a mosca dos estábulos. Os percentuais de mortalidade foram de 89,58 e 83,97% quando aplicados em pó e de 41,46 e 22,72% em solução aquosa, para a mosca doméstica e mosca dos estábulos, respectivamente. Esses resultados indicaram que a mosca doméstica foi mais suscetível e que o fungo foi mais virulento na formulação em pó. Vários outros estudos foram feitos contra adultos da mosca doméstica e *B. bassiana* se mostrou eficiente com taxas de mortalidade sempre superiores a 85% (WATSON et al., 1996; KAUFMAN et al., 2005; LECUONA et al., 2005).

Reithinger et al. (1997) avaliaram a ação de *B. bassiana* contra os mosquitos flebotomíneos, vetores da leishmaniose, em plantações de café na Colômbia. Os mosquitos infectados passaram por exames histopatológicos e os dados mostraram que o fungo foi eficaz em infectá-los sob condições naturais. Do mesmo modo Geetha & Balaraman (1999) avaliaram o potencial de *B. bassiana* contra os 2º e 3º instars das larvas de *Culex quinquefasciatus* Say, *Anopheles stephensis* Meigen e *Aedes aegypti* Linnaeus. As larvas de *C. quinquefasciatus* foram mais suscetíveis do que as de *A. stephensis* e o tempo letal variou entre o estágio larval dos dois mosquitos, deste modo as larvas de 2º instar dessas duas espécies foram mais suscetíveis do que as de 3º instar. As larvas de *A. aegypti* foram resistentes à infecção por *B. bassiana*.

Estudos de De La Rosa et al. (2002) mostraram a ação de diferentes linhagens de *B. bassiana* sobre larvas e fêmeas adultas da mosca mexicana das frutas (*Anastrepha ludens* Loew). Os autores verificaram que o fungo causou baixa mortalidade em larvas e elevada mortalidade em adultos, quando se utilizou a maior concentração. Ainda Davidson & Chandler (2005) avaliaram a ação deste fungo contra larvas e adultos da praga do repolho (*Delia antiqua* Meigen) com taxas de mortalidade variando de 4,8 a 22,8% sobre larvas e 22,3 a 100% em adultos. *B. bassiana* foi testada contra outras pragas do repolho (*D. radicum* Linnaeus e *D. floralis* Fallen) indicando que podem interferir de algum modo em seus ciclos de vida (VÄNNINEN et al., 1999; BRUCK et al., 2005).

2.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DE *Zaprionus indianus*

As espécies de *Zaprionus* ocorrem principalmente nas regiões Afrotropical, Oriental e Australiana e não são consideradas pragas nessas regiões (VILELA et al., 2001). Esse gênero é formado por dois subgêneros e 56 espécies. A principal delas, *Z. indianus* é uma mosca de aproximadamente 2,5 a 3,0 mm de comprimento, com corpo marrom claro, olhos vermelhos e apresentam caracteristicamente faixas longitudinais pretas e brancas ao longo da região dorsal da cabeça e do tórax. Os ovos são de coloração leitosa, fusiformes, tendo em uma de suas extremidades quatro filamentos. A larva mede aproximadamente 0,5 mm e tem coloração leitosa no final da fase larval e o pupário é de cor castanha (LACHAISE & TSACAS, 1983). Estudos revelaram que leveduras e bactérias estavam presentes em altas concentrações em todos os figos infestados com *Z. indianus*, o que não foi visto em frutos saudáveis, indicando uma estreita relação entre a comunidade microbiana e *Z. indianus* (GOMES et al., 2003). As moscas de *Zaprionus*, como acontece com a maioria dos drosofilídeos, alimentam-se fundamentalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, especialmente frutos em decomposição. O substrato em fermentação geralmente é utilizado pelos adultos como local de alimentação, corte e oviposição e pelas larvas, como sítio de desenvolvimento e por vezes de puparização (VILELA et al., 2001).

Stein et al. (2003) observaram um comportamento peculiar nas fêmeas não-receptivas de *Z. indianus*, que ao serem abordadas pelos machos que se aproximam, geralmente por trás, e que exibem algum comportamento de corte, vibram violentamente o corpo, permanecendo com as pernas fixas ao substrato e curvando simultaneamente a extremidade abdominal em direção ao cortejador. Esse comportamento geralmente repele os machos, impedindo-os de montar sobre as fêmeas. Este comportamento não é observado nas espécies de *Drosophila*, provavelmente pode caracterizar as demais espécies de *Zaprionus*. Ainda neste sentido Stein et al. (2003) ao estudarem a biologia dessa mosca sugeriram que o período de incubação dos ovos dar-se aproximadamente dentro de 24 horas. O ciclo de ovo a adulto está ao redor de 15 a 20 dias e os adultos mantidos a temperatura de 22° C podem sobreviver por mais de 80 dias (Figura 1).

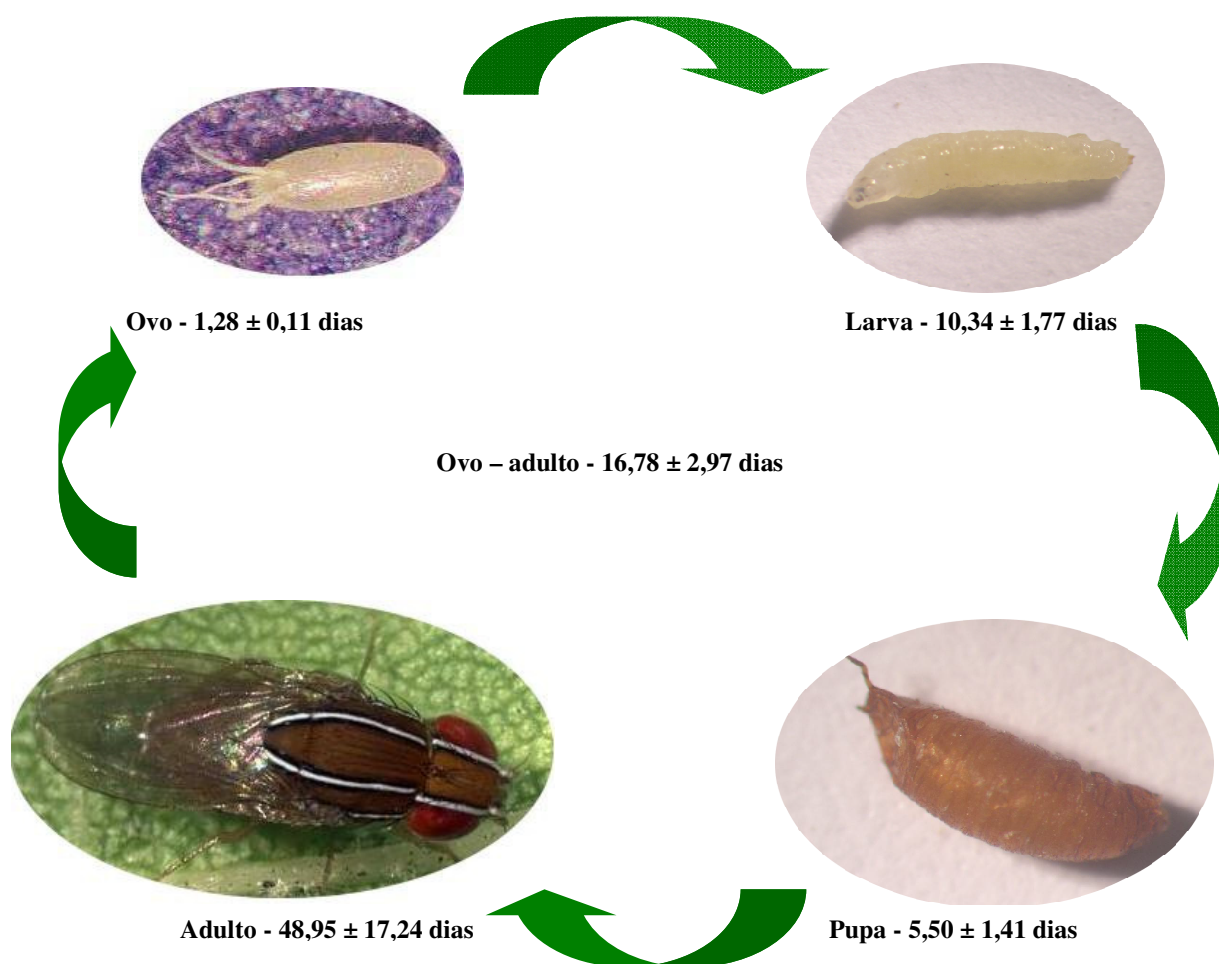


Figura 1: Ciclo de vida de *Zaprionus indianus*, adaptado.

Fonte: Stein et al. (2005); Van Der Linde (2006);

Disponível em: <http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus>

<http://www.kimvdlinde.com/professional/index.html>

Araripe et al. (2004) verificaram que a tolerância térmica medida através dos limites de temperatura induzindo a esterilidade do macho, também mostra algumas diferenças com relação a *D. melanogaster*. Machos desta espécie são mais tolerantes ao frio e levam o mesmo tempo para recuperar a fertilidade tanto quando submetidos a um estresse de temperatura baixa quanto a um estresse de temperatura alta. Em *Z. indianus*, a recuperação ao estresse de temperatura baixa é mais rápida que ao de temperatura alta.

Lachaise & Tsacas (1983) observaram que imagos de *Z. indianus* emergiram de frutos de 74 espécies de 31 famílias de plantas. Convém notar que vários frutos citados (cajá-mirim, mamão, goiaba, abacaxi, abacate) não são nativos do continente africano, mas introduzidos a partir do Novo Mundo. Por outro lado, as 74 espécies citadas incluem algumas não africanas que foram igualmente introduzidas na América, onde são extensamente cultivadas (cítricos, manga, carambola). Essa capacidade de se desenvolver em uma gama de substratos de diferentes origens geográficas deverá permitir uma expansão notavelmente rápida da espécie alienígena por praticamente todo o continente americano (VILELA et al., 2001). Esta característica é potencialmente mais danosa em regiões de fruticultura, como o Vale do Rio São Francisco onde estão estabelecidos vários agronegócios voltados para a fruticultura de exportação (SANTOS et al., 2003).

Karan et al. (2000) demonstraram a existência de diferenças genéticas e morfológicas entre populações dessa mosca na Índia, fornecendo deste modo uma evidência de seleção natural e adaptação local. Além disso, esses estudos sugerem que as populações indianas têm potencial evolutivo para responder a condições externas e diferenciar-se de populações em outras localidades de distribuição da espécie. Do mesmo modo Setta & Carareto (2005) avaliaram os componentes do valor adaptativo de *Z. indianus*, amostrados em uma população de um município de São Paulo. Observaram que a longevidade foi maior do que aquelas registradas em populações indianas, enquanto que a produtividade e o tempo de desenvolvimento foram similares ou maiores do que os observados em outros *Drosophilidae*. Esses dados contribuem para o entendimento do sucesso de colonização desta espécie.

De Toni et al. (2001) ao registrarem a primeira ocorrência de *Z. indianus* no estado de Santa Catarina, observaram que em todos os lugares e substratos (banana, goiaba, carambola) as porcentagens das amostras da mosca aumentaram de janeiro a abril de 2000,

contudo o número de espécies de outros Drosophilidae parece ter sido preservado. Entretanto Castro & Valente (2001) ao estudarem comunidades de drosofilídeos em Porto Alegre, notaram que antes da invasão de *Z. indianus*, a frequência de *D. simulans* Sturtevant e *D. willistoni* Sturtevant eram maiores. Deste modo, a mosca alienígena poderia estar afetando a estabilidade dessas comunidades na região. Ainda Silva et al. (2005) avaliaram a eficiência da colonização de *Z. indianus* na mesma cidade e observaram que a chegada da invasora parece estar promovendo ajustes nas estratégias de sobrevivência das espécies residentes, pelo menos em certos períodos quando a frequência das populações da invasora aumenta significativamente. Todavia, a maioria dos outros drosofilídeos sugere que terão condições de coexistir com a invasora.

Quanto ao controle deste inseto, ainda existem poucos estudos, pois até recentemente não causava danos econômicos nas culturas. Deste modo alguns métodos de controle cultural podem ser empregados para reduzir sua população: limpeza de pomares e seus arredores; queimar ou enterrar qualquer tipo vegetal que possam entrar em decomposição, pois podem constituir focos de criação da mosca (STEIN et al. 2003). Neste sentido Raga et al. (2003) avaliaram a eficiência de diferentes protetores de ostíolo do figo contra o ataque de *Z. indianus*. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de etiqueta adesiva colada sobre os ostíolos do figo que reduziu 73,6 a 91,6% a infestação dos frutos pela mosca. A porcentagem de redução das infestações variou de 34,7 a 83,3% para o tratamento com gel, de 53,8 a 82,5% para o tratamento com a calda bordalesa e de 0,0 a 69,7% para o tratamento com fertilizante foliar Bordasul.

Quanto aos inimigos naturais, foram relatadas as primeiras ocorrências dos parasitóides *Spalandia endius* Walker, *Leptopilina bouhardi* Barbotin et al. e *Pachycrepoideus vindeminae* Rondani em pupas de *Z. indianus*, com prevalência total de parasitismo de 3,8%, 2,2% e 3,5%, respectivamente (MARCHIORI & SILVA, 2003; MARCHIORI et al., 2003; SILVA et al., 2004). Essas espécies de Hymenoptera são parasitóides de pupas de numerosos dípteros, especialmente de *D. melanogaster*, e vem assumindo importante papel na regulação de insetos-praga (WHARTON et al., 1998). Carneiro-Leão (2006) realizou o primeiro estudo de controle biológico desta mosca por fungos entomopatogênicos. O autor avaliou a eficiência de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* contra larvas. Os dois fungos testados demonstraram elevada

patogenicidade, diminuindo significativamente a emergência dos adultos nas maiores concentrações testadas.

2.5 OCORRÊNCIA DE *Zaprionus indianus*

Zaprionus indianus é uma mosca potencialmente cosmopolita que, aparentemente por intermediação humana, devido à intensificação do comércio global de frutas, tem se espalhado nas últimas décadas pelas regiões tropicais (KARAN, 2000; VILELA 2001). Apesar de restritas a estas regiões *Z. indianus* mostra características generalistas e é capaz de adaptar-se a diferentes condições ambientais (PARKASH & YADAV, 1993). Tal versatilidade ecológica pode ter sido a razão do sucesso na fase de estabelecimento.

O primeiro registro publicado de *Z. indianus* no continente americano faz referência a exemplares adultos observados em 20 de março de 1999, sobre caquis em início de decomposição, dos quais emergiram moscas daquela espécie em Santa Isabel, região metropolitana de São Paulo (VILELA, 1999). Nesta mesma época, na região de Valinhos (SP), durante a safra de figo da variedade roxo, foi constatada a presença de uma grande quantidade de *Z. indianus* se alimentando e fazendo postura no ostíolo do fruto em início de maturação. Uma grande quantidade de larvas também foi observada dentro de alguns frutos, tornando-os impróprios para o consumo humano, assumindo um comportamento de praga incomum entre drosofilídeos (VILELA et al., 2001) (Figura 2).

De Toni et al. (2001) coletaram 10 espécimes sobre frutos de uma planta exótica no Morro da Lagoa da Conceição em dezembro de 1999, depois coletaram mais espécimes em janeiro e posteriormente em abril de 2000 em municípios de Santa Catarina. Estes emergiram de frutos de uma planta exótica, mostrando o lado generalista desta mosca, capaz de explorar com sucesso substratos preferencialmente usados por espécies nativas de *Drosophila*. Já Castro & Valente (2001) registraram pela primeira vez a ocorrência de *Z. indianus* em Porto Alegre. Os autores coletaram os espécimes, de cinco diferentes locais, em frutos de uma *Palmae* em 2000. A mosca foi bem representativa nas amostras do outono, mas não o foram no inverno e na primavera, voltando a aparecer no verão. Estes

resultados poderiam significar que esta mosca pode sobreviver nas temperaturas baixas do inverno, sugerindo que é capaz de ajustar-se às regiões temperadas ou ainda que as moscas encontradas no verão subsequente corresponderam a uma nova invasão de *Z. indianus*. Intensificando os estudos de ocorrência de *Z. indianus*, Kato et al. (2004) ao analisarem amostras de insetos, em municípios de Minas Gerais, coletadas em armadilhas contendo atrativo à base de bagaço de cana e melaço, com a finalidade de monitorar o *Strategus* sp. (Coleoptera) obtiveram amostras dessa mosca. Esta foi encontrada posteriormente se alimentando de carambola, provenientes do município de Contagem, inviabilizando-as para o consumo. Ainda foram coletadas em pomares de manga, dos municípios de João Pinheiro, Dom Bosco, Vargem Grande do Rio Pardo, Verdelândia, Montes Claros, Janaúba e Jaíba. Deste modo Van Der Linde et al. (2006) registraram a primeira ocorrência de *Z. indianus* em outubro de 2003 na Ilha Contadora, no Panamá. Em 2005, após novas coletas, espécimes da mosca foram obtidas em Tallahassee, na Flórida. Em todos os casos, as moscas foram recolhidas de iscas de banana. Desde então se observa muitos indivíduos na vegetação aberta na Flórida. De acordo com os autores o cenário baseado nas suas observações é que esta espécie tem se espalhado através da América Central e o Caribe e que chegou aos Estados Unidos da América entre 2004 e 2005.



Figura 2. Figs infestados por larvas de *Zaprionus indianus*.

Fonte: Stein et al. (2005)

Disponível em: <http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus>

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia e no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 Linhagens de *Beauveria bassiana*

Foram utilizadas *Beauveria bassiana* URM3447 e *B. bassiana* URM2916, da Coleção de Culturas - Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de *Beauveria bassiana* utilizadas no experimento.

Fungo	Código das linhagens	Número de acesso da Micoteca	Hospedeiro	Ano de estocagem
<i>Beauveria bassiana</i>	CG 29	URM2916	Coleoptera	1987
	CL ₁	URM3447	<i>Castnia licus</i>	1991

3.3 Meios de cultura e Soluções utilizadas

- Batata-Dextrose-Ágar (BDA) - (Oxoid) e BDA acrescido de Cloranfenicol.
- *Tween* 80 (0,05%)
- Hipoclorito de sódio (4%)
- Álcool (70%)

3.4 Obtenção e Manutenção de *Zaprionus indianus*

As moscas utilizadas foram a *Z. indianus* VVI – Vila Velha Itamaracá, criadas rotineiramente no Laboratório de Genética Animal da UFPE e mantidas a aproximadamente 25° C, em cultura específica, para drosofilídeos, à base de banana e extrato de levedura, conforme a metodologia de Campos (2003).

3.5 Produção de conídios no arroz (VILAS BOAS et al., 1996).

Sacos de polipropileno contendo 100g de arroz, previamente autoclavados, foram inoculados com 10 mL da suspensão de 10^8 conídios/mL do fungo com 12 dias de crescimento em BDA. Após a inoculação, foi realizada a homogeneização do arroz nos sacos e incubados em BOD a $28 \pm 1^\circ$ C para o crescimento do fungo durante 12 dias e posterior elaboração das suspensões.

3.6 Quantificação do inóculo

Os conídios foram contados com o auxílio da câmara de Neübauer, segundo a metodologia de Moraes & Alves (1998). Um grama de arroz, contendo o fungo, foi homogeneizado em 100 mL de água destilada com *Tween* 80 (0,05%). Após agitação, a suspensão foi quantificada e ajustada para uma concentração de 10^8 conídios/mL, e a partir desta, foram obtidas concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios/mL.

3.7 Bioensaios

Foram realizados para avaliar a patogenicidade de *B. bassiana*, no controle das larvas de 3° instar (L3) e dos adultos da mosca-do-figo. Foram realizados três bioensaios para cada etapa de desenvolvimento, a temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C e umidade relativa a $70 \pm 10\%$.

3.7.1 Bioensaios com larvas de *Zaprionus indianus* (MACIEL et al., 2005)

Este bioensaio foi realizado com um grupo controle contendo água destilada com *Tween* 80 (0,05% v/v) e cinco tratamentos contendo suspensões de conídios nas diferentes concentrações (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 conídios/mL). Para cada concentração testada, foram utilizadas cinco repetições com 10 larvas. As larvas foram mergulhadas nas suspensões fúngicas, durante 10 segundos e em seguida transferidas para recipientes contendo meio específico para drosofilídeos. Foram feitas observações diárias para análise dos parâmetros biológicos (período de pré-pupa, estágio pupal, ritmo de emergência e percentual de emergência de adultos).

3.7.2 Bioensaios com adultos de *Zaprionus indianus* (TEFERA & PRINGLE, 2003)

O bioensaio foi realizado com um grupo controle contendo água destilada mais *Tween* 80 (0,05% v/v) e cinco tratamentos contendo suspensão de conídios nas diferentes concentrações (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 conídios/ mL). Para cada concentração testada, foram utilizadas cinco repetições com 10 adultos. Os adultos foram imobilizados a base de éter e em seguida foram pulverizados com as suspensões fúngicas. Após o tratamento as moscas foram mantidas em recipientes com meio específico. As observações foram feitas diariamente para análise da morte acumulativa.

3.7.3 Esporulação de *Beauveria bassiana* em cadáver de *Zaprionus indianus* (DIMBI et al., 2003)

Cinco adultos mortos, após 10 dias, foram individualizados em cinco vidros com tampa de rosca contendo um mL de *Tween* (0,05%). Os tubos foram agitados em Vortex (dois a três minutos) para desprendimento dos conídios da superfície dos insetos. A suspensão foi quantificada com o auxílio da câmara de Neübauer.

3.7.4 Reisolamento do fungo após colonização sobre *Zaprionus indianus* (ALVES, 1998)

Uma parcela, de larvas e adultos mortos, foi lavada em solução de álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 4% e água destilada autoclavada, durante dois segundos, três minutos e três minutos, respectivamente. Os insetos foram secos em papel filtro autoclavado e incubados em BOD a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ com 80% de umidade relativa, onde foi observada a conidiogênese do fungo. O fungo reisolado foi semeado em BDA (adicionado de Cloranfenicol) para análise das microestruturas e do crescimento micelial.

3.8 Viabilidade dos conídios (ALVES & PEREIRA, 1998)

A viabilidade dos conídios foi verificada através da observação da germinação. Fragmentos da cultura fúngica com 12 dias de crescimento foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de *Tween* (0,05%), sendo o número de conídios quantificados em câmara de Neübauer até a obtenção de uma suspensão de 10^8 conídios/mL. Desta suspensão, 0,1 mL foi espalhado com o auxílio da alça de Drigalsky, em placas de Petri, em quintuplicata, contendo BDA e incubados a 25°C . O percentual de germinação foi determinado, contando-se 500 conídios (entre germinados e não germinados) por placa após 16 horas de inoculação, utilizando a fórmula:

$$G = \frac{n \times 100}{500} = \% \text{ de germinação}$$

Onde n = número de conídios germinados

3.9 Cultura em lamínula

Fragmentos da colônia fúngica foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, sobre os quais foram colocadas lamínulas, previamente flambadas. Aguardou-se o crescimento, durante 24, 48, 72, 96, 120 horas. Ao final de cada tempo

uma lamínula foi retirada com uma pinça e colocada invertida sobre uma lâmina contendo Azul de Amann e observado sob microscópio óptico para análises das estruturas fúngicas (DOMSCH & GAMES, 1993).

3.10 Mensuração do crescimento colonial

Com o auxílio de uma alça de platina, foram transferidos fragmentos das culturas para o centro de uma placa de Petri, contendo BDA. As colônias foram mensuradas com o auxílio de uma régua milimetrada aos 3, 6, 9, 12, 15 dias, após a inoculação, o diâmetro foi expresso em centímetros. O experimento foi realizado em quintuplicata.

3.11 Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram submetidos à análise de Probit para obtenção da CL_{50} e TL_{50} (Programa POLO PC) e ao teste F (ANOVA) (Programa STATISTIX na versão 7.0). No caso de diferença significativa na aplicação do ANOVA foi utilizado o Teste de Duncan (Programa SAEG na versão 5.0) a 5% de probabilidade, para comparação pareada das médias (EUCLYDES, 1983).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros biológicos de larvas de *Zaprionus indianus*

Nos testes de viabilidade, a germinação dos conídios de *B. bassiana* URM2916 e *B. bassiana* URM3447 variou entre 96 a 98%, após 16 horas de inoculação.

A análise estatística dos parâmetros biológicos demonstrou que o período médio de pré-pupa da mosca, a partir de larvas infectadas, variou de 1,06 a 1,98 dias para *B. bassiana* URM2916 e de 1,33 a 1,6 dias para *B. bassiana* URM3447, sem diferença significativa entre o grupo controle (1,3 dias) e as concentrações utilizadas. Já o estágio pupal variou de 6,1 a 8,8 dias para *B. bassiana* URM2916 e de 6,1 a 7,7 dias para *B. bassiana* URM3447, onde apenas a concentração de 10^8 conídios/mL diferiu significativamente dos demais tratamentos. Assim, apenas a maior concentração (10^8) das duas linhagens foi eficaz em retardar o desenvolvimento do inseto, aumentando o estágio pupal em aproximadamente três dias em relação ao grupo controle (5,9 dias). Esses resultados estão de acordo com os de Maciel et al. (2005) que estudaram a patogenicidade de *B. bassiana* contra os estágios de desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria* Fabricius. Várias concentrações foram testadas (10^8 a 10^5 conídios/mL) e observaram que os estágios pré-pupal e pupal das larvas tratadas aumentaram proporcionalmente com as concentrações utilizadas, evidenciando que o fungo interferiu no desenvolvimento deste hospedeiro. Darwish & Zayed (2002) já enfatizaram que os efeitos da infecção em larvas são demonstrados em estágio posteriores, como a redução da emergência de adultos.

Tabela 2. Período médio (dias) de pré-pupa e estágio pupal de *Zaprionus indianus*, a partir de larvas infectadas com *Beauveria bassiana* (URM2916 e URM3447).

ESTÁGIO	TRATAMENTO	LINHAGENS	
		URM2916	URM3447
PRÉ-PUPA	CONTROLE	1,3 (A,a)	1,3 (A,a)
	10 ⁴	1,06 (A,a)	1,33 (A,a)
	10 ⁵	1,46 (A,a)	1,40 (A,a)
	10 ⁶	1,4 (A,a)	1,5 (A,a)
	10 ⁷	1,9 (A,a)	1,5 (A,a)
	10 ⁸	1,98 (A,a)	1,6 (A,a)
	CV (%)= 34, 4710		
PUPA	CONTROLE	5,9 (A,a)	5,9 (A,a)
	10 ⁴	6,1 (A,a)	6,1 (A,a)
	10 ⁵	6,2 (A,a)	6,2 (A,a)
	10 ⁶	6,6 (A,ab)	6,2 (A,a)
	10 ⁷	6,9 (A,ab)	6,3 (A,a)
	10 ⁸	8,8 (B,b)	7,7 (B,ab)
	CV (%)= 12, 2735		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letras minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P=0,05).

CV= Coeficiente de variação

Os dados obtidos referentes ao ritmo de emergência, indicaram que a emergência ocorreu entre o 6º e 7º dia após o período pupal, tanto no grupo controle quanto nas larvas tratadas com as duas linhagens estudadas e diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração fúngica utilizada ao longo dos dias. No grupo controle o pico de emergência de insetos no 9º dia (47,34%), porém para a maioria das concentrações, este pico ficou em torno do 10º dia quando os insetos foram expostos a *B. bassiana* URM2916 (Figura 3) e

permaneceu com o pico no 9º dia para a maioria das concentrações de *B. bassiana* URM3447, conforme mostra a Figura 4.

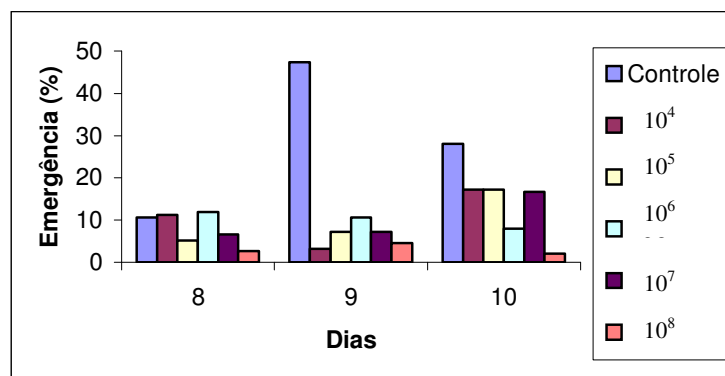


Figura 3. Ritmo de emergência de adultos de *Zaprionus indianus*, a partir de larvas infectadas com *Beauveria bassiana* URM2916.

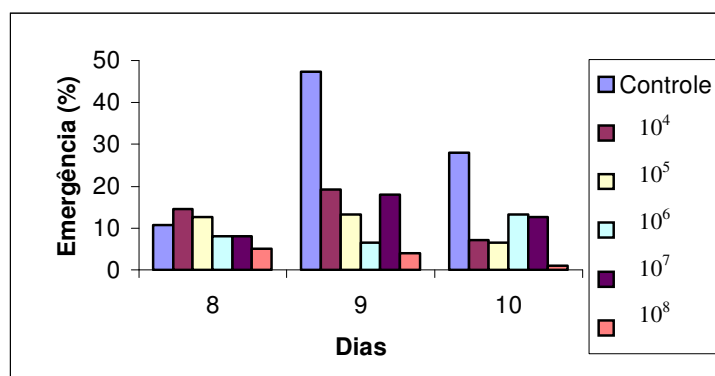


Figura 4. Ritmo de emergência de adultos de *Zaprionus indianus*, a partir de larvas infectadas com *Beauveria bassiana* URM3447.

Os resultados encontrados corroboram com os de Feijó (2004) quando utilizou o mesmo fungo contra *C. albiceps*. O ritmo de emergência da mosca diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração fúngica utilizada. Carneiro-Leão (2006) e Carneiro-Leão et al. (2006), utilizaram *M. anisopliae* contra larvas de *Z. indianus* e mostraram que durante todo o período avaliado, o percentual de emergência do grupo

controle, diferiu das demais concentrações, com diferença significativa também entre as linhagens utilizadas.

As análises de emergência de adultos a partir de larvas infectadas de *Z. indianus* indicaram que o grupo controle diferiu de todos os tratamentos e teve a maior média de emergência entre todos os tratamentos testados: 97,33% . O aumento na concentração de *B. bassiana* foi associado com a diminuição da média de emergência de adultos. Este comportamento foi observado nas duas linhagens utilizadas (Tabela 3).

Estes dados concordam com os de Reithinger et al. (1997) quando avaliaram o potencial biológico de *B. bassiana* sobre mosquitos flebotomíneos, onde o tempo médio de sobrevivência de adultos no grupo controle (58,9h) foi superior ao tempo de vida dos insetos que foram expostos ao fungo (41,6h). No presente estudo o percentual médio de emergência de moscas após 14 dias variou de 57,33 a 10,6% para *B. bassiana* URM2916 e de 53,33 a 13,33% para *B. bassiana* URM3447, não apresentando estatisticamente diferença significativa entre as linhagens analisadas. Quando foi feita análise pareada entre as concentrações, as duas linhagens mostraram que não houve diferença entre 10^4 (57,3 e 53,3%) e 10^5 (51,3 e 52%); 10^6 (44 e 39,33%) e 10^7 (40,6 e 40,66%), apenas a concentração 10^8 (10,6 e 13,3%) diferiu de todos os tratamentos.

Os valores encontrados são menores do que os de Barson et al. (1994) quando avaliaram o efeito de seis espécies de fungos entomopatogênicos contra a mosca doméstica. Os autores observaram que o percentual de emergência, após 14 dias de exposição a *B. bassiana*, foi de 55% (10^5) e 16% (10^7). Na concentração de 10^8 obtiveram 20% de emergência, valor superior aos encontrados nesta pesquisa. Este modo de ação também foi detectado por Angel-Sahagún et al. (2005) que avaliaram a suscetibilidade dos estágios biológicos da *Haematobia irritans* Linnaeus a vários fungos. *B. bassiana* foi aplicada sobre ovos da mosca e os dados mostraram que a emergência de adultos foi de 11,3% para *B. bassiana* BB17 e de 43,8% para *B. bassiana* BB21 e a média de emergência do controle foi de 72%. Essas diferenças na virulência mostram a variabilidade existente entre linhagens de uma mesma espécie fúngica, justificando a necessidade da seleção de linhagens mais patogênicas. Carneiro-Leão (2006) ao estudar a infectividade de *M. anisopliae* sobre *Z. indianus*, enfatizou que a mosca foi suscetível ao fungo, com médias de emergência variando de 94% (10^4) a 13,33% (10^8) para *M. anisopliae* var. *acridum* e de 93,33 (10^4) a

13,33% (10^8) para *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Diferentemente, De la Rosa et al. (2002) demonstraram que a emergência de adultos da mosca mexicana das frutas a partir de larvas infectadas com 10^8 conídios/mL de *B. bassiana*, variou de 92 a 98% não diferindo da emergência do grupo controle que foi de 100%.

Tabela 3. Percentual de emergência de adultos de *Zaprionus indianus* após 14 dias de exposição das larvas à *Beauveria bassiana*.

TRATAMENTO	LINHAGENS	
	URM2916	URM3447
CONTROLE	97,33 (A,a)	97,33 (A,a)
10^4	57,33 (B,a)	53,33 (B,a)
10^5	51,33 (BC,a)	52,0 (B,a)
10^6	44,0 (D,a)	39,33 (C,a)
10^7	40,6 (CD,a)	40,66 (C,a)
10^8	10,6 (E,a)	13,33 (D,a)

CV(%) = 22,8668

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letras minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P=0,05).

CV= Coeficiente de variação

4.2 Parâmetros biológicos de adultos de *Zaprionus indianus*

A aplicação de *B. bassiana* sobre adultos causou mortalidade, independentemente da linhagem, a partir do 2º dia após infecção. Esses resultados se assemelham aos de Kaaya & Munyinyi (1995), que relataram a ocorrência de 10% de mortalidade em 2 dias após a emergência de adultos da mosca africana, quando expostos a *B. bassiana*.

No presente estudo, observou-se que a mortalidade foi crescente ao longo dos dias, independentemente da linhagem e da concentração (Tabela 4). Esse comportamento

não foi observado nas linhagens de *B. bassiana* utilizadas nos estudos feitos por Watson et al. (1996), quando avaliaram a ação deste fungo contra mosca doméstica durante 28 dias. Os autores demonstraram que a patogenicidade do fungo diminuiu com o tempo, sendo alta a mortalidade apenas no 1º e 4º dia. A redução na virulência pôde ser atribuída a diversos fatores, como o tempo de formação dos conídios, tendo em vista que conídios velhos podem ser menos infectivos do que os recém-formados. Ainda no que se referem às observações da mortalidade diária, revelaram que apenas houve diferença significativa entre a concentração 10^8 e os demais tratamentos a partir do 6º dia após a infecção. No 9º dia, o grupo controle diferiu de todos os tratamentos e esta diferença manteve-se até ao final do experimento. Vale ressaltar que no 9º dia, as concentrações 10^6 e 10^7 já haviam causado mortalidade superior a 50% e que na concentração de 10^8 esta média foi de 90%, indicando o potencial infectivo das linhagens utilizadas. No 12º dia não houve diferença entre as concentrações de 10^5 e 10^6 e nem entre 10^7 e 10^8 , padrão observado nas duas linhagens utilizadas (Tabela 4).

Tabela 4. Percentagem média de mortalidade acumulada de *Zaprionus indianus* em diferentes dias após infecção por *Beauveria bassiana*.

TRATAMENTOS	TEMPO (DIAS)			
	3	6	9	12
CONTROLE	8,00 A	10,60 A	10,60 A	10,60 A
10^4	13,30 A	19,33 AB	36,00 B	44,60 B
10^5	14,00 A	25,33 AB	47,00 B	60,30 C
10^6	12,00 A	21,66 AB	50,00 B	65,60 C
10^7	11,30 A	27,66 AB	68,60 C	83,60 D
10^8	11,30 A	36,00 B	91,30 D	93,60 D
CV(%)=	48,55	38,73	22,27	15,30

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P= 0,05).

CV= Coeficiente de variação

O percentual médio de mortalidade após 12 dias de exposição ficou entre 52 e 98% para *B. bassiana* URM2916 e de 37,33 a 88,66% para *B. bassiana* URM3447. A mortalidade do grupo controle não excedeu 11% (Tabela 5). A análise estatística mostrou

que houve diferença significativa entre as linhagens utilizadas e entre as concentrações dentro de uma mesma linhagem. O percentual de mortalidade ao final do experimento para a linhagem URM2916 foi de 52, 63 e 64%, nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/mL, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Porém estas diferiram de 10^7 e 10^8 , que apresentaram taxas de mortalidade de 92 e 98% sem variação estatística. Já para *B. bassiana* URM3447, a menor mortalidade foi causada pela concentração de 10^4 (37%), todas as demais ultrapassaram 50% e na concentração mais elevada, o percentual foi de 88,66%, diferindo de todas as demais (Tabela 5). Os resultados revelam maiores índices de mortalidade entre as linhagens foram observadas nas concentrações de 10^4 , 10^7 e 10^8 , onde *B. bassiana* URM2916 causou mortalidade superior à outra linhagem analisada, apenas nas concentrações mais elevadas.

Tabela 5. Percentual de mortalidade de *Zaprionus indianus* após 12 dias de exposição de adultos a *Beauveria bassiana*.

TRATAMENTOS	LINHAGENS	
	URM2916	URM3447
CONTROLE	10,66 (A, a)	10,66 (A, a)
10^4	52,00 (B, a)	37,33 (B, b)
10^5	63,33 (B, ab)	56,66 (C, a)
10^6	64,00 (B, ab)	68,00 (CD, a)
10^7	92,66 (C, a)	74,00 (D, b)
10^8	98,66 (C, a)	88,66 (E, b)

CV (%)= 18,7146

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letras minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P= 0,05).

CV= Coeficiente de variação

Os resultados apresentados na Tabela 5 estão de acordo com os de Dimbi et al. (2003) que avaliaram a ação de duas linhagens de *B. bassiana* contra adultos de *Ceratitis capitata* Wiedemann e de *C. rosa* Karsch. Apenas uma linhagem apresentou elevada patogenicidade, com percentuais de mortalidade de 93,3 e 77,2%. Já Davidson & Chandler

(2005) em experimentos de laboratório, observaram a suscetibilidade de adultos *D. antiqua* a nove isolados de *B. bassiana*, reisolados de diferentes hospedeiros. A maioria das linhagens causou mais que 50% de mortalidade em cinco dias após a infecção, não havendo correlação entre a virulência e a origem do isolado. Variações na virulência entre isolados da mesma espécie fúngica foi verificada por Angel-Sahagún et al. (2005), onde isolados de *B. bassiana* foram diferentemente patogênicos a *H. irritans*, com taxas de 40 a 73,8%. Lecuona et al. (2005) testaram a ação de 19 isolados deste fungo contra machos e fêmeas da mosca doméstica. Apenas cinco isolados produziram mortalidade superior a 85% e foi observada diferença na suscetibilidade quanto ao sexo do inseto, sendo os machos mais suscetíveis. Watson et al. (1995), demonstraram que a virulência de *B. bassiana* contra moscas variou quanto à formulação do fungo. A mortalidade mais alta foi causada nas formulações em pó (89,58%), do que nas formulações aquosas (41,46%). Ainda Tefera & Pringle (2003) relataram que as diferenças na patogenicidade, podem ser devido ao método de exposição do hospedeiro ao fungo. Os autores avaliaram a suscetibilidade de *C. partellus* a três diferentes métodos de exposição a *B. bassiana* e observaram que a mortalidade variou com o método aplicado.

Os valores da CL₅₀ para as linhagens de *B. bassiana*, estimados pelo teste de Probit, foram de $1,09 \times 10^5$ e $3,8 \times 10^6$ conídios/mL, para *B. bassiana* URM2916 e *B. bassiana* URM3447, respectivamente. Esses dados confirmam a primeira linhagem como a mais virulenta, devido a sua menor CL₅₀ (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração Letal (CL₅₀) (conídios/mL) das linhagens de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Zaprionus indianus*.

LINHAGENS	CL ₅₀ (IC _{0,1}) ^(a)	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO	χ^2 ^(b)
URM2916	$1,09 \times 10^5$ ($0,28 \times 10^4 - 6,6 \times 10^5$)	$Y = 2,785 + 0,4396 * \log x$	5,13
URM3447	$3,8 \times 10^6$ ($1,4 \times 10^5 - 2,8 \times 10^7$)	$Y = 1,3934 + 0,5477 * \log x$	6,19

^(a) Intervalo de confiança significativo a 10%;

^(b) Calculado pelo Probit.

Esta relação de alta virulência e da baixa CL_{50} foi observada também por Lecuona et al. (2005) ao avaliarem a ação de *B. bassiana* sobre moscas domésticas e os resultados encontrados foram superiores aos mostrados neste trabalho. A CL_{50} variou de $5,2 \times 10^9$ a $17,4 \times 10^9$ conídios/mL, para as linhagens mais infectivas, onde a mortalidade variou de 90 a 97%. Contudo, assemelham-se aos de De La Rosa et al. (2002), que ao avaliarem a infectividade de *B. bassiana* contra a mosca mexicana das frutas, obtiveram CL_{50} que variaram de $5,13 \times 10^5$ a $9,07 \times 10^6$ conídios/mL. Deste modo, a estimativa da CL_{50} é um importante parâmetro para a seleção de patógenos (ALVES, 1998).

O TL_{50} foi calculado pelo teste de Probit, contudo os dados da concentração 10^8 conídios/mL de *B. bassiana* URM3447 não se adequou ao modelo, por ter ocorrido um χ^2 significativo e uma elevada heterogeneidade dos dados. Desse modo, optou-se por uma análise de variância com teste de comparação das médias de mortalidade, com regressão polinomial para determinar a equação de tempo/resposta. Isto também foi observado por Paz Júnior (2006) nas pesquisas sobre a virulência de *B. bassiana* contra *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera).

As diferenças na virulência entre as linhagens de *B. bassiana* foram confirmada pelos valores do TL_{50} . Na maior concentração (10^8) o TL_{50} foi de 5,3 dias para *B. bassiana* URM2916 (Tabela 7) e de 7,0 dias para *B. bassiana* URM3447 (Figura 5), sendo o TL_{50} de todas as concentrações sempre superiores para esta linhagem. De maneira geral, o TL_{50} foi decrescente à medida que se aumentou a concentração fúngica. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Tefera & Pringle (2003), onde revelaram que o TL_{50} de *B. bassiana* sobre *C. partellus*, variou com o modo de infecção e com o aumento da concentração. O menor TL_{50} (um dia) foi obtido quando as larvas foram mergulhadas na maior concentração fúngica. O TL_{50} médio encontrado também está de acordo com os obtidos por Almeida et al. (2005), ao estudarem a ação de *B. bassiana* URM3447 sobre *A. grandis*. Os autores obtiveram um TL_{50} médio de 6,5 dias. E diferem dos encontrados por Loureiro & Monteiro (2004) ao avaliarem a suscetibilidade da formiga cortadeira (*A. sexdens sexdens*) a duas linhagens de *B. bassiana*. Os valores do TL_{50} foram de 2,75 e de 3,00 na concentração de 10^8 . Para Silva et al. (2003) o TL_{50} deve ser utilizado como um parâmetro complementar na determinação da infectividade, considerando que é mais importante à efetiva redução populacional da praga do que a rapidez com que se processa.

Tabela 7. Tempo Letal (TL₅₀) das linhagens de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Zaprionus indianus*.

LINHAGENS	CONCENTRAÇÃO	TL ₅₀ (IC _{0,05}) ^(a)	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO	χ^2 ^(b)
URM2916	10 ⁴	10,54 (8,94 – 13,28)	3,1825 + 1,776 *logX	8,30
	10 ⁵	8,35 (7,22 – 10,02)	2,9174 + 2,259*logX	12,4
	10 ⁶	10,36 (8,65 – 13,64)	2,6535 + 2,310*logX	15,9
	10 ⁷	5,82 (5,05 – 6,61)	1,8529 + 4,113*logX	26,7
	10 ⁸	5,33 (4,80 – 5,84)	1,3218 + 5,061*logX	17,95
URM3447	10 ⁴	18,43 (14,52-27,89)	2,1528 +2,249*logX	2,30
	10 ⁵	10,62 (9,55-12,23)	1,9035 + 3,017*logX	1,85
	10 ⁶	9,65 (8,15-12,53)	2,0936 + 2,948*logX	24,3
	10 ⁷	9,45 (8,24-11,48)	1,2129 + 3,881*logX	26,2
	10 ⁸	Não se adequou ao modelo		

^(a) Intervalo de confiança significativo a 5%;^(b) Calculado pelo Probit.

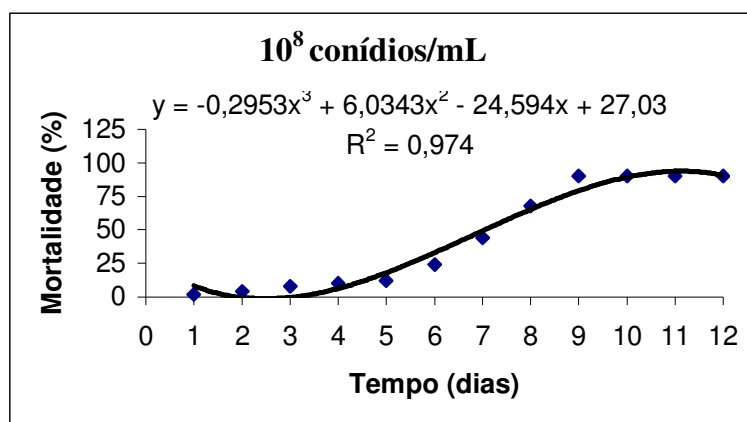


Figura 5. Percentual da mortalidade média de adultos de *Zaprionus indianus* infectados com *Beauveria bassiana* URM3447, ao longo do tempo.

Para avaliação da esporulação em cadáveres de *Z. indianus*, foram utilizados os insetos mortos que apresentavam sinais de infecção por *B. bassiana* (Figura 6). Os insetos do grupo controle, que eventualmente morreram não apresentaram nenhum sinal de infecção fúngica. Os dados revelaram que a esporulação foi de $1,46 \times 10^7$ conídios/mL para *B. bassiana* URM2916 e de $1,36 \times 10^7$ conídios/mL para *B. bassiana* URM3447, sem diferença significativa entre elas (Tabela 8). Do mesmo modo a conidiogênese de *B. bassiana* sobre os insetos mortos foi avaliada por Luz & Fargues (1998) e os resultados mostraram que a esporulação foi maior quando os insetos foram incubados a 25° C, que diminuiu a 28-30° C e foi quase nula a 35° C. Esses resultados confirmam que a temperatura é um fator determinante na produção de conídios sobre cadáveres de qualquer espécie, portanto deve ser levada em consideração nas aplicações de *B. bassiana* no controle biológico de pragas. Além disso, a esporulação em cadáveres, como citado por Tefera & Pringle (2003) é essencial para multiplicação e disseminação do patógeno em futuras gerações e em novas populações de insetos.

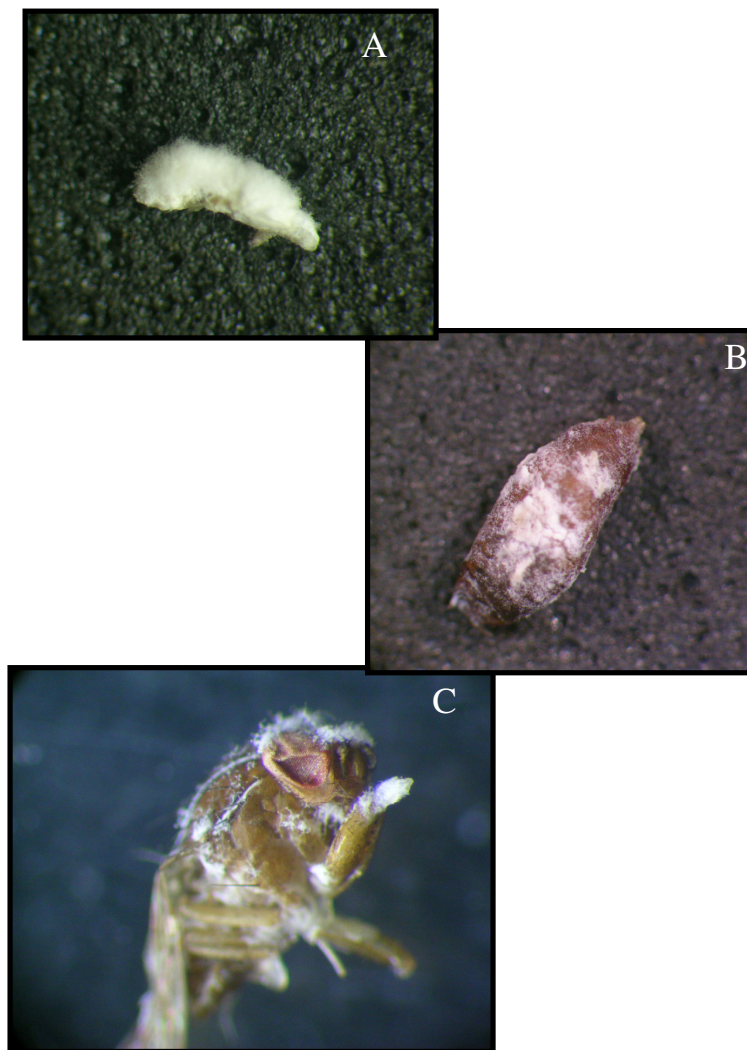


Figura 6. Diferentes fases de desenvolvimento de *Zaprionus indianus*, infectados por *Beauveria bassiana*. A (larva), B (pupa) e C (adulto).

Tabela 8. Produção de conídios de *Beauveria bassiana* URM2916 e *Beauveria bassiana* URM3447 sobre cadáveres de *Zaprionus indianus* ($\times 10^7$ conídios/ mL).

LINHAGENS	ESPORULAÇÃO
URM2916	1, 4667A
URM3447	1, 3600 A
CV (%) = 26,166	
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P=0,05).	

4.3 Parâmetros biológicos das linhagens antes e após passagem pelo inseto

4.3.1 Aspecto e crescimento da colônia fúngica

Após o reisolamento do fungo em adultos de *Z. indianus* foi determinado o comportamento dessas linhagens em relação ao padrão (linhagens sem contato com a mosca).

Observações feitas durante 15 dias de crescimento do fungo em BDA, a temperatura de 25° C, revelaram que as colônias de *B. bassiana* (padrão e reisolada) apresentaram coloração esbranquiçada e aspecto cotonoso no centro e na periferia (Figura 7). Observações similares foram realizadas por Ferreira (2000), quando estudou os aspectos morfológicos de *B. bassiana* URM3447.

O crescimento radial das colônias das linhagens padrão, ao final do experimento, foi menor do que o crescimento das colônias reisoladas (Tabela 9). A taxa de crescimento entre as linhagens padrão registrou diferença significativa apenas no 9° e no 15° dia, já entre reisoladas esta diferença foi vista em todos os dias, exceto no 3° e 6° dia. Foi observado também quando se comparou linhagem padrão e a reisolada. Em *B. bassiana* URM2916 houve diferença entre o crescimento do padrão e do reisolado a partir do 9° dia, persistindo

até o 15º dia. Já em *B. bassiana* URM3447, esta diferença só foi observada no 12º e no 15º dia. No último dia do experimento, as médias de crescimento foram de 5,7 cm (padrão) e 6,6 cm (reisolado) para *B. bassiana* URM2916 e foi de 5,8 (padrão) e 6,9 cm (reisolado) para *B. bassiana* URM3447. Esses dados foram superiores aos encontrados por Almeida et al. (2005) ao estudarem linhagens de *B. bassiana* padrão e reisolada de *A. grandis*. As taxas encontradas, aos 15 dias de crescimento, foram de 6,23; 6,10; 6,26 e 5,5 cm para os reisolados de ovos, larvas, adultos e o padrão, respectivamente. Esses resultados se repetiram nas pesquisas de Nascimento (2003) onde o reisolado obteve 5,08 cm de crescimento, enquanto o padrão obteve 4,88 cm. Do mesmo modo Feijó (2004) observou que o crescimento colonial de *B. bassiana* sempre foi maior após passagem pelo hospedeiro, demonstrando assim que houve o revigoramento do fungo.

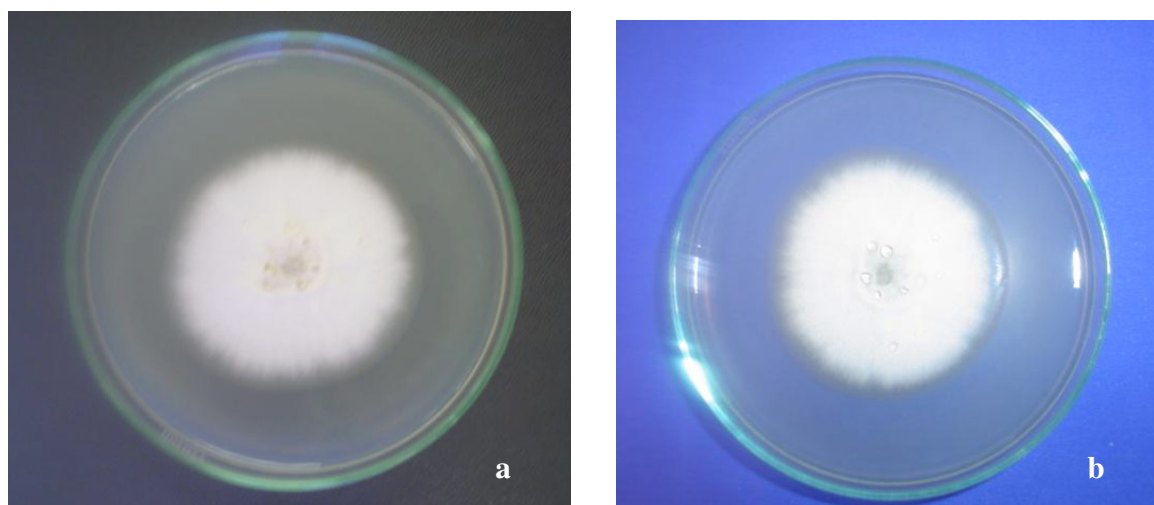


Figura 7. Crescimento radial de *Beauveria bassiana* URM2916 padrão (a) e reisolada de *Zaprionus indianus* (b) após 15 dias em BDA.

Tabela 9. Crescimento radial (cm) das linhagens de *Beauveria bassiana* padrão e reisolada de *Zaprionus indianus*.

TEMPO (DIAS)	LINHAGENS			
		URM2916		URM3447
3	P*	1,22 (A,a)	P	1,22 (A,a)
	R	1,68 (A,a)	R	1,12 (A,b)
6	P	2,4 (A,a)	P	2,5 (A,a)
	R	2,76 (A,a)	R	2,5 (A,a)
9	P	3,2 (A,b)	P	3,8 (A,a)
	R	4,08 (B,a)	R	3,94 (A,a)
12	P	4,7 (A,a)	P	4,82 (A,a)
	R	5,3 (B,b)	R	5,54 (B,a)
15	P	5,7 (A,a)	P	5,8 (A,a)
	R	6,6 (B,b)	R	6,9 (B,a)
CV(%)= 2,48				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letras minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P= 0,05).

P* fungo padrão (sem passagem pelo inseto)

R fungo reisolado

4.3.2 Análise microscópica

As características morfológicas das linhagens de *B. bassiana* apresentaram aspectos compatíveis com os descritos na literatura (DE HOOG, 1972; LUNA-ALVES LIMA & TIGANO, 1989). Foi observada a formação de micélio nas primeiras 24 horas,

para todas as linhagens. Em *B. bassiana* URM2916 (padrão) foi observada em 48 horas a presença de estruturas leveduriformes (Figura 8) e às 72 horas conidióforos jovens e às 120 horas formavam densos cachos (Figura 9). No reisolado, o desenvolvimento do fungo foi acelerado, os conidióforos iniciaram o desenvolvimento dentro de 48 horas e às 72 horas já formavam cachos. Já em *B. bassiana* URM3447 (padrão), foi observada às 72 horas primórdios de conidióforo (Figura 10) e a formação de várias anastomoses (Figura 11), importantes estruturas para iniciar o ciclo parassexual dos fungos anamóficos (Azevedo, 1998). Às 120 horas, foram observados vários conidióforos em cachos. Contudo o reisolado mostrou as mesmas características precocemente, de forma intensa e abundante. Em todas as estruturas evidenciadas, não foram encontradas diferenças morfológicas entre o padrão e o reisolado.



Figura 8. Estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* URM2916, após 48 horas em BDA.

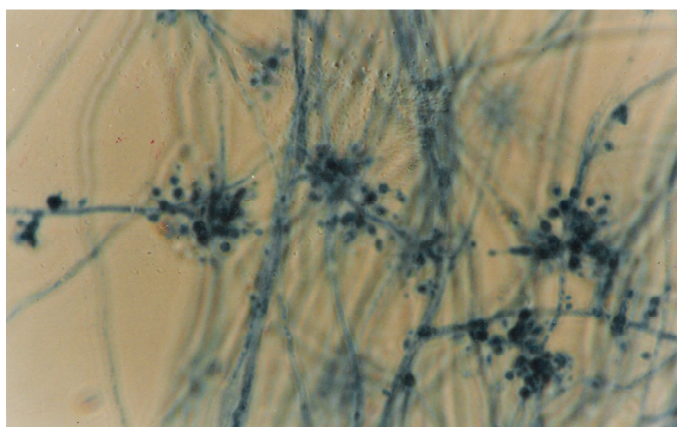


Figura 9. Conidióforos de *Beauveria bassiana* URM2916, após 120 horas em BDA.



Figura 10. Conidióforo jovem de *Beauveria bassiana* URM3447, após 72 horas em BDA.

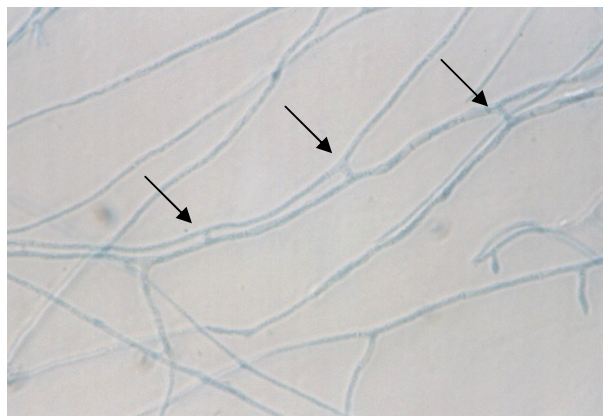


Figura 11. Anastomoses de *Beauveria bassiana* URM3447, após 72 horas em BDA.

5. CONCLUSÕES

- *Beauveria bassiana* é eficaz em diminuir o estágio pupal e o percentual de emergência de adultos, a partir de larvas infectadas, em todas as concentrações testadas;
- As linhagens de *B. bassiana* são potencialmente patogênicas aos adultos de *Z. indianus*, porém *B. bassiana* URM2916 foi mais virulenta;
- Os valores da CL₅₀ e TL₅₀ confirmam a variação na infectividade existente entre as linhagens utilizadas nesta pesquisa;
- *Beauveria bassiana* URM2916 e *Beauveria bassiana* URM3447 após passagem pelo inseto demonstram as mesmas características morfológicas de forma intensa e abundante;
- *Zaprionus indianus* é suscetível ao fungo utilizado, indicando que *B. bassiana* é potencialmente um agente biocontrolador desta mosca.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A. C. **Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *flavoviridae* e *Beauveria bassiana* a *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) em cana-de-açúcar e compatibilidade com inseticidas químicos.** 2005. 110f. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

ALMEIDA, J. C. **Patogenicidade e viabilidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* ao *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae).** 2005. 102f. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

ALMEIDA, J. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Viabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) artificialmente infectado. **Arquivo do Instituto Biológico.** v. 72, p. 473-480, 2005.

ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-371.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 845-869.

ALVES, L. F.A.; GASSEN, M. H.; PINTO, F. G.S.; NEVES, P. M.O.J.; ALVES, S.B. 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.** v. 34, p. 507-510, 2005.

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUES, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VALÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological states of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**. v. 5, p. 1-8, 2005.

ARARIPE, L.O.; KLACZKO, L.B.; MORETEAU, B.; DAVID, J. R. Male sterility thresholds in a tropical cosmopolitan drosophilid, *Zaprionus indianus*. **Journal of Thermal Biology**. v. 29, p. 73-80, 2004.

ATHAYDE, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviridae* sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* da região semi-árida paraibana**. 2002. 138f .Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos**. Goiânia: Editora da UFG, 1998, 478p.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica*, L.), a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 64, p. 107-113, 1994.

BENHAM, R.W.; MIRANDA, J.L. The genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling borers. **Mycologia**. v. 45, p.727-745, 1953.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 5, p. 81-84, 1996.

BROWNBIDGE, M.; COSTA, S.; JARONSKI, S. T. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 77, p. 280-283, 2001.

BRUCK, D. J.; SNELLING, J. E.; DREVES, A. J.; JAROSNKI, S. T. Laboratory bioassays of entomopathogenic fungi for control of *Delia radicum* (L.) larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 89, p. 179-183, 2005.

BUSTILLO, A. E.; CÁRDENAS, R.; POSADA, F. J. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. **Neotropical Entomology**. v. 31, p. 35-639, 2002.

CAMPOS, S.R.S.L.C. **Fotomapa dos cromossomos politênicos e localização dos genes HSP70 e HSP83 de *Zaprionus indianus***. 2003. 44f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

CARNEIRO, M. E.; MONTEIRO, S. G.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effects of isolate 986 of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., on eggs of the tick *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 8, p. 59-62, 1999.

CARNEIRO-LEÃO, M. P. **Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em *Zaprionus indianus***. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

CARNEIRO-LEÃO, M.P.; PESSOA, N.D.S.; BRASILEIRO, B.V.; VILA NOVA, M.X.; RIEGER, T.T.; SANTOS, J.F.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus indianus*. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, XVII, 2006, Recife. **CD ROM**, Recife: SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA, 2006.

CASTRO, F. L.; VALENTE, V.L.S. *Zaprionus indianus* is invading Drosophilid communities in the southern brazilian city of Porto Alegre. **Drosophila Information Service**. v. 84, p. 15-17, 2001.

CHERRY, A. J.; ABALO, P.; HELL, K. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. **Journal of Stored Products Research**. v. 41, p. 295-309, 2005.

CLARCK, T. B.; KELLEN, W. R.; FUKUDA, T.; LINDEGREN, J. E. Field and laboratory studies of the patogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitos. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 11, p. 1-7, 1968.

CORONADO, R. P.; MÁRQUEZ, A. D. Descripcion de ordenes y famílias. In: CORONADO, R. P.; MÁRQUEZ, A. D (Eds.) **Introducción a la Entomologia**. México: Limusa-Wiley, 1972. p.127-220.

DARWISH, E.; ZAYED, A. Pathogenecity of two entomopathogenic hyphomycetes, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, to the house fly *Musca domestica*. **Journal of Egyptian of Society of Parasitology**. v. 32, p. 785-796, 2002.

DAVIDSON, G.; CHANDLER, D. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi against larvae and adults of onion maggot (Diptera: Anthomyiidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 98, p. 1848-1855, 2005.

DE LA ROSA, W.; LOPEZ, F. L.; LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**. v. 95, p. 36-43, 2002.

DE HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**. v.1, p.1-39, 1972.

DE TONI, D. C.; HOFMANN, P. R. P.; VALENTE, V. L. S. First record of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Biotemas**. v. 14, p. 71-85, 2001.

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

DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A.; EKESI, S.; MUEKE, J. K. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). **Mycopathologia**. v. 156, p. 375-382, 2003.

DOMSCH, H.H.; GAMES, W. **Compendium of Soil Fungi**. San Francisco: IHW-Verlag, 1993, 856p.

ESTRADA, M. E.; ROMERO, M.; RIVERO, M. J.; BARROSO, F. Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 21, p. 42-43, 2004.

EUCLYDES, R.F. **Manual de Utilização do Programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa, 1983, 59p.

FARGUES, J.; LUZ, C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 75, p. 202–211, 2000.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 22, p. 18-21, 2001.

FEIJÓ, F. M. C. **Ação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium flavoviridae* var. *flavoviridae* no desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* sob condições de laboratório**. 2004. 126f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

FERREIRA, U. L. **Crescimento e condição nuclear de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviridae* em meio de cultura e substratos naturais diferentes**. 2000. 68 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: H.D. BURGESS. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p. 465-482.

FIGUEIRÊDO, M. F. S.; MARQUES, E. J.; LIMA, R. O. R.; OLIVEIRA, J. V. 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). **Neotropical Entomology**. v.31, p.397-403, 2002.

FRANÇA, I. W. B.; MARQUES, E. J.; TORRES, J. B.; OLIVEIRA, J. V. Efeitos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podidus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 349-356, 2006.

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., MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, S. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: ESALQ, 2002. 920p.

GEETHA, I.; BALARAMAN, K. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. **Indian Journal of Experimentas Biology**. v. 37, p. 1148-1150, 1999.

GOMES, L. H.; ECHEVERRIGARAY, S.; CONTI, J. H.; LOURENÇO, M. V. M.; DUARTE, K. M. R. Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Dip.: Drosophilidae). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 125-130, 2003.

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

KAAYA, G. P. *Glossina morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. **Acta Tropica**. v. 46, p. 107-114, 1989.

KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tse tse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 66, p. 237-241, 1995.

KARAN, D.; DUBEY, S.; MORETEAU, B.; PARKASH, R.; DAVID, J. R. Geographical clines for quantitative traits in natural populations of a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. **Genetica**. v. 108, p. 91-100. 2000.

KATO, C. M.; FOUREAUX, L. V.; CÉSAR, R. A.; TORRES, M. P. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) no estado de Minas Gerais, **Ciência Agrotecnológica**. v. 28, p. 454-455, 2004.

KAUFMAN, P. E.; REASOR, C.; RUTZ, D. A.; KETZIS, J. K.; ARENDS, J. J. Evaluation de *Beauveria bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York State. **Biological Control**. v. 33, p. 360-367, 2005.

LACHAISE, D.; TSACAS, L. Breeding-sites in tropical african drosophilids. In: ASBURNER, M., CARSON, H. L., THOMPSON JR, J. N. **The Genetics and Biology of Drosophila**. v. 3, p. 221-332, 1983.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TAROCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. **Journal of Medical Entomology**. v. 42, p. 332-336, 2005.

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, p. 139-147, 2003.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 71, p. 35-40, 2004.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**. v. 29, p. 553-561, 2005.

LUNA-ALVES LIMA E. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 84, suplemento III, p. 17-20, 1989.

LUNA-ALVES LIMA E. A.; TIGANO M. S. Citologia das estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* de meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. **Revista de Micologia**. v. 20, p. 85-94, 1989.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 72, p. 97-103, 1998.

LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, p. 839-846, 1998.

LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 73, p. 223-225. 1999.

MACIEL, M. V.; LUNA-ALVES LIMA, E. A.; ALVES, N. D.; FEIJÓ, F. M.C. Ação de *Beauveria bassiana* no desenvolvimento pós embrionário de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) em laboratório. **Caatinga**. v. 18, p. 1-5, 2005.

MACGUIRE, M. R.; LELAND, J. E.; DARA, S.; PARK, Y-H; ULLOA, M. Effect of different isolates of *Beauveria bassiana* on field populations of *Lygus hesperus*. **Biological Control**. v. 38, p. 390-396, 2006.

MACLEOD, D. M., Investigations on the genera *Beauveria* Vuill and *Tritirachium* limber. **Canadian Journal of Botany**. v. 32, p. 818-893, 1954.

MARCHIORI, C. H.; SILVA, C. G. First occurrence of parasitoid of *Spalangia endius* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) in pupas of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 63, p.361-362, 2003.

MARCHIORI, C. H.; ARANTES, S. B.; PEREIRA, L. A.; SILVA FILHO, O. M.; BORGES, V. R. First Record of *Leptopilina bouvardi* Barbotin et al. (Hymenoptera: Figitidae: Eucolinae) parasitizing *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera:Drosophiliade) no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 24, p. 321-324, 2003.

MARQUES, E. J.; ALVES, S. B.; MARQUES, I. M.R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** . v. 29, p. 303-307, 2000.

MOINO JR, A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. **Journal of Applied Entomology**. v. 122, p. 198-205, 1998.

MOINO JR, A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; NEVES, P. M. O. J.; PEREIRA, R. M.;

VIEIRA, S. A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**. v. 59, p. 267-273, 2002.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Ação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em ovos do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**. v. 28, p. 461-466, 1998.

MORAES, S. A.; ALVES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777.

NASCIMENTO, F. S. B. **Ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* e parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephallus sanguineus***. 2003. 57 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**. v. 33, p. 51-56, 2004.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**. v. 34, p. 77-82, 2005.

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 meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; J. L. AZEVEDO (Eds.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 297-317.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 172-176, 1991.

PARKASH, R.; YADAV, J.P. Geographical clinal variation at seven esterase-coding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. **Hereditas**. v. 119, p. 161-170. 1993.

PAZ JÚNIOR, F. B. **Ação patogênica de linhagens de *Beauveria bassiana* sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), análise genética (PCR) e compatibilidade com inseticidas químicos.** 2006, 196f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, M. V.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**. v.35, p.855-861, 2005.

RAGA, A.; SOUZA FILHO, M. F.; SATO, M. E. Eficiência de protetores de ostíolo do figo sobre a infestação da mosca *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) no campo. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 70, p. 287-289, 2003.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53, p. 544-547, 2001.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R.; CADENA, H.; ALEXANDER, B. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potencial biological control agent Phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 70, p. 131-135, 1997.

RICE, W. C.; COGBURN, R. R. Activity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against three coleopteran pests of stored grains. **Journal of Economic Entomology**. v. 92, p. 691-694, 1999.

SANTOS, J. F.; RIEGER, T. T.; CAMPOS, S. R. C.; NASCIMENTO, A. C. C.; FÉLIX, P. T.; SILVA, S. V. O.; FREITAS, F. M. R. Colonization of Northeast region of Brazil by drosophilid flies *Drosophila melerkotliana* and *Zaprionus*, a new potential insect pest for Brazilian fruticulture. **Drosophila Information Service**. v. 86, p. 92-95. 2003.

SETTA, N.; CARARETO, C. M. A. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. **Iheringia**. v. 95, p. 47-51, 2005.

SILVA, C. A. D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 4-8, 2001.

SILVA, V. C. A.; BARROS, R.; MARQUES, E. J.; TORRES, J. B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**. v. 32, p. 653-658, 2003.

SILVA, C. G.; COSTA, R. I. F.; MARCHIORI, C. H.; TORRES, L. C.; AMARAL, B. B. Ocorrência de *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani, 1875) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) coletados em frutos de goiaba. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 71, p. 91-92, 2004.

SILVA, N. M.; FANTINEL, C. C.; VALENTE, V. L. S.; VALLIATI, V. H. Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of Drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. **Neotropical Entomology**. v. 34, p. 363-374, 2005.

ST. LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biochemistry**. v. 204, p. 991-1001, 1992.

STEIN, C. P.; TEIXEIRA, E. P.; NOVO, P. S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Entomotropica**. v. 18, p. 219-221, 2003.

STEIN, C.P.; TEIXEIRA, E.P.; NOVO, J.P.S. **Mosca do figo - *Zaprionus indianus***. Disponível em < <http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus> > Acesso em: 15 / mar. 2005.

STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; KRAMER, J. P. First report of the occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica*. **Journal of Medicine Entomology**. v. 27, p. 309-312, 1990.

SUN, J.; FUXA, J. R.; HENDERSON, G. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 84, p. 38-46, 2003.

TEFERA, T.; PRINGLE K. L. Effect of method to *Beauveria bassiana* and concentration on mortality, mycosis and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 84, p. 90-95, 2003.

TODOVORA, S. I.; CLOUTIER, C.; CÔTE, J.-C.; CODERRE, D. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F) (Hem., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**. v. 126, p. 182-185, 2002.

VAN DER LINDE, K. *Zaprionus indianus*: taxonomic and species identification. Disponível em < <http://www.kimvdlinde.com/professional/index.html> > Acesso em: 01 abr. 2006.

VAN DER LINDE, K.; STECK, G. J.; HIBBARD, K.; BIRDSLEY, J. S.; ALONSO, L. M.; HOULE, D. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. **Florida Entomologist**. v. 89, p. 402-404, 2006.

VÄNNINEN, I.; HOKKANEN, H.; TYNI-JUSLIN, J. Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* L. *Delia floralis* (Fall.) (Dipt., Anthomyiidae) with entomopathogenic fungi: laboratory and greenhouse tests. **Journal of Applied Entomology**. v. 123, p. 107-113, 1999.

VICENTINI, S.; FARIA, M.; OLIVEIRA, M. R.V. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. **Neotropical Entomology**. v. 30, p. 97-103. 2001.

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

VILELA, C. R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical Region? **Drosophila Information Service**. v. 82, p. 37-39. 1999.

VILELA, C. R.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), In: VILELA, C. R.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Eds.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 48-51, 2001.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**. v. 5, p. 405-411, 1995.

WATSON, D. W.; RUTZ, D. A.; LONG, S. J. *Beauveria bassiana* and sawdust bedding for the management of the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in calf hutches. **Biological Control**. v. 7, p. 221-227, 1996.

WHARTON, S. M.; VRUSKI, S. M.; GILTRAP, F. E. Neotropical Eucoilidae (Cynipoidea) associated with fruit-infesting Tephritidae, with new records from Argentina, Bolivia and Costa Rica. **Journal of Hymenoptera Research**. v. 7, p. 102-115, 1998.

WRIGHT, M. S.; OSBRINK, W. L. A., LAX, A. R. Transfer of entomopathogenic fungi among formosan subterranean termites and subsequent mortality. **Journal of Applied Entomology**. v. 126, p. 20-23, 2002.