

EFEITOS DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) E COMPATIBILIDADE COM
INSETICIDAS

por

LAURICÍ MARIA PIRES DOS SANTOS

(Sob Orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

RESUMO

Um dos fatores limitantes da produtividade da cultura do tomateiro é a ocorrência de pragas, destacando-se *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae). A aplicação intensiva de inseticidas no controle convencional desse inseto torna relevante a busca por métodos alternativos que possam compor o Manejo Integrado desta praga. Esta pesquisa teve como objetivos avaliar a patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill para ovos e lagartas de *T. absoluta*, estudar a compatibilidade destes patógenos com inseticidas, investigar o processo de infecção de *M. anisopliae* sobre ovos e avaliar seu efeito na fecundidade e mortalidade de fêmeas. Todos os isolados testados apresentaram patogenicidade a ovos e lagartas de *T. absoluta*, sendo *M. anisopliae* mais patogênico. Destacaram-se os isolados URPE-6 causando infecção de 95% sobre ovos e URPE-19 com mortalidade de 42% sobre lagartas de primeiro ínstar. Foi determinada a CL₅₀ do isolado URPE-6 de *M. anisopliae* sobre ovos de *T. absoluta*, obtendo-se um valor de $3,5 \times 10^4$ conídios mL⁻¹. Testou-se a compatibilidade dos isolados URPE-6 e URPE-19 com Nim, Clorfenapir, Indoxacarbe, Espinosade e Abamectina. Os produtos Clorfenapir e Nim foram tóxicos ao isolado URPE-19 e Abamectina e Nim apresentaram toxicidade para o isolado URPE-6, nas dosagens recomendadas pelo fabricante. A

avaliação ultra-estrutural dos ovos infectados pelo isolado URPE-6 de *M. anisopliae* nos períodos de 6, 12, 24, 48 e 72h após a aplicação do patógeno, demonstrou que o processo de penetração dos conídios ocorreu dentro do período de 6 horas, confirmando sua virulência. Foi observada a presença de corpos hifais no interior do ovo, nos períodos de 12 e 24h. No período de 72h após a infecção ocorreu intensa extrusão do micélio cobrindo a superfície externa dos ovos. O isolado URPE-6 não apresentou efeito sobre a oviposição e fecundidade de *T. absoluta*, porém afetou a sobrevivência. A utilização de *M. anisopliae* representa mais uma alternativa no controle de *T. absoluta*, principalmente no estágio de ovo, sendo possível associação deste patógeno com inseticidas utilizados no controle desta praga.

PALAVRAS-CHAVE: Controle microbiano, compatibilidade, inseticidas, ultra-estrutura, ovos, lagartas, adultos

EFFECTS OF THE FUNGI *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. AND *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL ON *Tuta absoluta* (MEYRICK) AND THEIR COMPATIBILITY WITH INSECTICIDES

by

LAURICÍ MARIA PIRES DOS SANTOS

(Under the direction of Professor Edmilson Jacinto Marques)

ABSTRACT

The control of *Tuta absoluta* (Meyrick) is usually done with intensive insecticide sprays, which has led to the research of alternative control methods as part of the tomato leafminer integrated management in tomato crops. The objective of this work was to evaluate the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill isolates on eggs and larvae of *T. absoluta*, and their compatibility with insecticides used to control this pest. Also, it was investigated the infection process of *M. anisopliae* on eggs and the effect over fecundity and mortality of females. Although both fungi showed pathogenicity to eggs and larvae of *T. absoluta*, *M. anisopliae* showed higher pathogenicity than *B. bassiana*. Among the isolates of *M. anisopliae* tested, URPE-6 and URPE-19 caused 95% and 42% infection in eggs and 1st instar larvae, respectively. The LC₅₀-value for *T. absoluta* eggs was 3.5×10^4 conidia.mL⁻¹ of the URPE-6 isolate. The compatibility of isolates URPE-6 and URPE-19 with neem, chlorfenapyr, indoxacarb, spinosad and abamectin was evaluated. Field dosages of chlorfenapyr and neem were toxic to the isolate URPE-19, while abamectin and neem showed toxicity to the isolate URPE-6. Ultra-structure analysis of URPE-6 infecting eggs showed that the process of conidia penetration occurred within 6 h after application of the fungus. Bodies of hyphae presence

and intense micelle extrusion were observed in eggs at 12 and 72 h after application, respectively. The URPE-6 isolate did not show any effect on egg-laying preference and fecundity of *T. absoluta* females, but it affected their survivals. The use of entomopathogenic fungi is a potential alternative control for *T. absoluta* mainly at the egg stage, and it may be associated with insecticides used in the control of this tomato pest.

KEY-WORDS: Microbial Control, compatibility, insecticides, ultra-structure, eggs,
 larvae, adults

EFEITOS DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) E COMPATIBILIDADE COM
INSETICIDAS

por

LAURICÍ MARIA PIRES DOS SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2008

EFEITOS DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) E COMPATIBILIDADE COM
INSETICIDAS

por

LAURICÍ MARIA PIRES DOS SANTOS

Comitê de Orientação:

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

José Vargas de Oliveira - UFRPE

Sérgio Batista Alves - ESALQ/USP

RECIFE - PE

Fevereiro – 2008

EFEITOS DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) E COMPATIBILIDADE COM
INSETICIDAS

por

LAURICÍ MARIA PIRES DOS SANTOS

Orientador:

Edmilson Jacinto Marques

Examinadores:

Ailton Pinheiro Lôbo - UFRPE

Fábio A. Brayner dos Santos - CpqAM-FIOCRUZ

José Vargas de Oliveira - UFRPE

Irene Maria Ramos Marques - UFPE

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

DEDICATÓRIA

A meu esposo Jorge Luiz e meus filhos Camilla, Leonardo e Rebecca,
por cercarem meu caminho de amor, carinho e muita alegria segurando minha
mão sempre que foi preciso para atravessar mais esta etapa de minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação de Entomologia Agrícola pela realização deste curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ e Laboratório de Pesquisa Keizo Asami (LIKA/UFPE), pela concessão do espaço e materiais necessários ao desenvolvimento de parte desta pesquisa;

Aos meus pais por estarem sempre por perto oferecendo carinho e apoio constantes;

Ao Prof. Edmilson Jacinto Marques pela orientação, amizade e apoio durante minha formação profissional;

À Prof.^a Irene Maria Ramos Marques que mesmo distante, sempre demonstrou incentivo, amizade e confiança;

Aos Profs. Valéria Wanderley Teixeira e Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pela amizade e disposição em colaborar na realização de algumas etapas deste trabalho;

À Prof.^a Auristela Correia de Albuquerque pela amizade desenvolvida e apoio sempre que foi necessário;

Ao Prof. Jorge Braz Torres pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos Profs. Ailton Lôbo e José Vargas de Oliveira pela amizade sugestões e colaborações;

Ao prof. Herbert Álvaro A. Siqueira pela amizade, sugestões e ajuda na elaboração dos abstracts;

Ao Prof. Marcelo Picanço pelo envio de materiais para realização de parte desta pesquisa;

Aos Profs. Luiz Carlos Alves e Fábio André Brayner dos Santos pela amizade, atenção e colaboração no desenvolvimento de parte desta pesquisa.

Aos técnicos Rafael Padilha e especialmente Sérgio Santos pela amizade, grande apoio e dedicação no preparo e leitura das amostras para microscopia eletrônica;

Ao amigo Adelmo Duarte de Santana pela incansável ajuda sempre que solicitado;

À amiga Suerda Wilna por compartilharmos durante todo o curso momentos de alegria e apoio mútuos;

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos: Júnior pelo constante companheirismo e apoio principalmente no final do curso, Cíntia e Rodrigo pela amizade e constante colaboração;

Aos amigos Aleuny, Andréa Nunes, Franklin, Marco Aurélio, Roberta e Shênia, pelo carinho, preocupação, companheirismo e disposição em ajudar;

A todos os amigos do curso de Pós-graduação em Entomologia Agrícola que cruzaram meu caminho e compartilharam um pouco de si.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	07
2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) E COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
AGRADECIMENTOS.....	26
LITERATURA CITADA.....	27
3 AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DOS OVOS DE <i>Tuta absoluta</i> (MEYRICK) E DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE FÊMEAS APÓS PARASITISMO POR <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK.....	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42

MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
AGRADECIMENTOS.....	51
LITERATURA CITADA.....	52

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A produção hortícola se apresenta como uma das principais atividades agrícolas, merecendo destaque na geração de empregos diretos e na permanência do homem no campo (Hora & Brandão Filho 2004). Dentre as hortaliças, o tomate destaca-se entre as mais importantes no contexto do agronegócio, movimentando as indústrias paralelas de insumos, embalagens, máquinas agrícolas e equipamentos de irrigação. O tomate para processamento representa a principal atividade geradora de renda para um grande número de produtores, tornando-se significativa fonte de renda regional (Melo & Vilela 2004).

O Brasil é o nono maior produtor mundial desta hortaliça (Agriannual 2007), que representa a segunda em importância no País, perdendo apenas para a batata (Luz *et al.* 2007). A produção nacional desta cultura na safra de 2007 foi de 3,1 milhões de toneladas, sendo os maiores estados produtores Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia e Pernambuco (IBGE 2007). Contudo sua condução é difícil, por ser muito susceptível a pragas e doenças exigindo a utilização de tecnologias durante todo o ciclo, causando assim alto custo econômico, ecológico e social.

No contexto das pragas, a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) tem sido de grande importância em praticamente todas as regiões onde o tomate é cultivado. Os adultos medem aproximadamente 6mm de comprimento e 10 mm de envergadura, apresentando geralmente uma coloração cinza-prateada, com pontos escuros na parte dorsal das asas anteriores. Os bordos das asas posteriores são franjados, assim como a parte apical das asas anteriores. As fêmeas fecundadas depositam seus ovos isoladamente nas folhas, no caule e no

cálice das flores. Estes apresentam inicialmente uma coloração amarelo-palha, que evolui para uma cor avermelhada, quando próximos à eclosão. O período de incubação varia de 3 a 6 dias a uma temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Haji *et al.* 1988).

As lagartas apresentam inicialmente uma coloração branca adquirindo posteriormente uma coloração verde arroxeada. Penetram nas folhas 20 a 45 minutos após a eclosão produzindo galerias (Coelho & França 1987) e passam por quatro instares distintos, que são caracterizados pelo diâmetro da cápsula cefálica (Giustolim *et al.* 2002). A pupação ocorre mais frequentemente nas folhas velhas e no solo. As pupas apresentam, inicialmente, coloração verde passando para marrom no período próximo a emergência dos adultos (Souza & Reis 1992). Em condições de laboratório, a uma temperatura de 28°C e 75% de U.R., foi observada uma duração média das fases larval e pupal de 11,9 e 6,5 dias, respectivamente (Pires & Marques 2002).

As injúrias são caracterizadas por galerias produzidas pelas lagartas que penetram nas folhas. Embora se alimentem do mesófilo foliar, as lagartas são ativas movimentando-se sobre a haste principal das plantas nas horas mais quentes do dia (Ullé & Nakano 1994), principalmente às de terceiro e quarto instares, que geralmente deixam as minas e caminham pelas folhas procurando outro local para se alimentarem ou para empuparem (França & Castelo Branco 1992). Em ataques severos, podem destruir completamente as folhas do tomateiro. Atacam também o caule e os frutos, depreciando-os para comercialização (Villas Bôas *et al.* 2005).

Para o controle desta praga os agricultores fazem aplicações intensivas de inseticidas, aumentando os custos de produção, acarretando danos à saúde do trabalhador e ao meio ambiente, além do risco de apresentar resíduos químicos nos frutos (Medeiros *et al.* 2005). Atualmente, a preocupação com o ambiente e a qualidade de vida tem difundido amplamente as correntes de agricultura alternativa, dentre elas, a agricultura orgânica, que visa diminuir os efeitos adversos do uso de produtos químicos no ecossistema. Comparando os aspectos agrônômicos e econômicos

da produção convencional e orgânica do tomateiro, utilizando como métodos de controle de pragas feromônios, extrato de nim, inseticida biológico e inimigos naturais, Luz *et al.* (2007) observaram que o custo de produção orgânica foi 17,2% menor e sua lucratividade foi 59,9% maior no verão e 113,6% no inverno.

Visando minimizar os problemas causados pelo uso indiscriminado de inseticidas, torna-se relevante a busca por outros métodos de controle que possam ser utilizados em um sistema de agricultura orgânica ou mesmo convencional, fazendo parte do Manejo Integrado desta praga. Uma das alternativas, provavelmente é a utilização de fungos entomopatogênicos, que podem estabelecer-se no solo como fonte de inóculo, não induzem a seleção de indivíduos resistentes e são efetivos agentes no controle de pragas (Alves 1998).

Os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. são produzidos e formulados mundialmente para o controle de insetos pragas de diversas Ordens, apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo geralmente isolados de amostras de solo e de insetos. Possuem a capacidade de afetar todas as fases de desenvolvimento dos insetos, desde os estágios imaturos até os adultos (Alves 1998).

Na seleção de isolados de *M. anisopliae* para o controle microbiano de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) e avaliação da virulência sobre as fases do desenvolvimento desse inseto, Rampelotti *et al.* (2007) demonstraram que ovos, ninfas e adultos são suscetíveis à infecção pelo isolado CG 891, sendo esse entomopatógeno um promissor agente de controle biológico da praga na cultura do arroz irrigado.

Estudando o efeito de *M. anisopliae* sobre *Blissus antililus* Leonard (Hemiptera: Lygaeidae) Samuels *et al.* (2002) observaram que diferentes isolados infectaram ovos desta praga, destacando-se o isolado ESALQ 818 que causou uma infecção de 96,7%, quando os ovos foram imersos em suspensão na concentração de 10^4 conídios mL⁻¹.

Tem sido demonstrado ainda, que diferentes isolados de *M. anisopliae* podem provocar efeitos variados na fecundidade de fêmeas infectadas. Quesada-Moraga *et al.* (2006) observaram, em condições de laboratório, que o fungo causou redução na fecundidade de fêmeas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). Por outro lado, Blanford & Thomas (2001), não observaram efeitos de *M.anisopliae* sobre o número de ovos/fêmea de *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera:Acrididae), quando estas foram tratadas topicamente.

Diversas pesquisas têm demonstrado o potencial destes patógenos no controle de lepidópteros de importância agrícola, tais como: *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Alves *et al.* 1987, Lezama-Gutiérrez 2000), *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera:Pyralidae) (Destéfano *et al.* 2004), *Mocis* spp. (Oppenheim 2001) e *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera:Plutellidae) (Vandenberg *et al.* 1998, Grimm 2001), seja através da constatação da ocorrência natural sobre os insetos no ambiente, ou através de pesquisas para utilização dos mesmos em programas de controle.

Com relação à *T. absoluta*, alguns estudos têm sido realizados para avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* a este inseto. Giustolim *et al.* (2001) observaram que *B. bassiana* isolado ESALQ 447, na concentração de 10^6 conídios mL⁻¹, causou mortalidade que variou entre 50,8 e 43,3% quando foram tratadas lagartas do primeiro e quarto ínstar, respectivamente.

Selecionando isolados nativos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para o controle de ovos de *T. absoluta* Rodriguez *et al.* (2006a) observaram variabilidade nos níveis de susceptibilidade dos ovos aos isolados testados, sendo os mais patogênicos Qu-B912 (*B. bassiana*) e Qu-M558 (*M. anisopliae*) que proporcionaram porcentagens de mortalidade de 60 e 80%, respectivamente. Rodriguez *et al.* (2006b) testaram esses mesmos isolados sobre lagartas de terceiro ínstar de *T. absoluta*, na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, obtendo mortalidade de 95% para o isolado Qu-B912 e 92% para Qu-M558, 10 dias após a inoculação.

Os fungos geralmente penetram no inseto através da cutícula. Os esporos dos fungos depois de aderidos germinam e penetram na cutícula do hospedeiro através de pressão mecânica e ação enzimática. A produção de enzimas por estes patógenos está correlacionada com processos de especificidade, patogenicidade e virulência (Alves 1998).

Pesquisas desenvolvidas com o auxílio de microscopia eletrônica têm ajudado a compreender o processo de penetração e infecção de fungos entomopatogênicos sobre os insetos. Estudando o desenvolvimento externo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre operários e soldados de *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae), Neves & Alves (2004) verificaram que a penetração desses fungos ocorreu mais rapidamente em regiões do corpo onde a cutícula era mais maleável do que em áreas com a cutícula mais endurecida, tendo isto ocorrido provavelmente pela baixa produção de exoenzimas necessárias à degradação da cutícula. Ocasionalmente foi observado um halo ao redor dos tubos de germinação dos isolados estudados, sugerindo uma produção de exoenzimas durante o processo de penetração. Estes autores observaram ainda que, além de fornecer informações básicas sobre os processos de infecção, estes estudos ajudam a identificar diferentes estratégias de infecção e velocidades de desenvolvimento que podem, parcialmente, explicar uma maior ou menor virulência encontrada nos isolados.

Desta forma, a utilização de um microrganismo em programas de controle biológico depende entre outros fatores, da seleção de linhagens virulentas e de sua adequação aos processos desenvolvidos para a aplicação do agente nas áreas de interesse. Em programa de manejo integrado de pragas, uma estratégia para a utilização de entomopatógenos é a sua conservação no agroecossistema, sendo necessário conhecer a sua interação com outros métodos de controle para que possam ser utilizados de forma eficiente (Batista Filho *et al.* 2001).

O conhecimento da compatibilidade de entomopatógenos a defensivos agrícolas é de grande importância em um sistema convencional de agricultura. Produtos compatíveis com determinados

microrganismos podem acelerar o processo da doença visando obter uma epizootia dentro de uma população de insetos, assim como, concorrer para a formação de focos primários das doenças (Alves *et al.* 1998).

Diversos estudos sobre a compatibilidade de entomopatógenos a inseticidas, em condições de laboratório, têm sido realizados para avaliar a seletividade destes produtos a microrganismos, obtendo-se informações relevantes para serem utilizadas no manejo de pragas em várias culturas. Assim, estudos de compatibilidade de *M. anisopliae* isolado E9, com Acetamiprid, Imidacloprid e Thiamethoxan nas concentrações recomendadas, realizados por Neves *et al.* (2001) constataram que não houve efeito negativo destes produtos sobre o patógeno. Outros estudos com diferentes inseticidas e isolados de *M. anisopliae*, mostraram uma grande variação na ação dos produtos sobre o crescimento vegetativo e a produção de conídios do fungo, sendo esta variação considerada em função da natureza química dos produtos, concentrações utilizadas e da espécie do entomopatógeno (Loureiro *et al.* 2002, Tanzini *et al.* 2002, Almeida *et al.* 2003). Alguns produtos empregados na agricultura podem ser prejudiciais ou até letais aos entomopatógenos, outros, porém, quando utilizados em doses recomendadas ou subletais, podem aumentar a atividade desses microrganismos (Alves *et al.* 1998).

Uma vez que o controle químico é amplamente utilizado no combate às pragas da cultura do tomateiro, torna-se relevante o estudo de seu efeito sobre agentes de controle biológico que possam vir a integrar o manejo desta cultura. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para ovos e lagartas de *T. absoluta*, estudar a compatibilidade destes patógenos com inseticidas utilizados no controle deste inseto, investigar o processo de infecção de *M. anisopliae* sobre ovos e avaliar seu efeito na fecundidade e mortalidade de fêmeas.

Literatura Citada

- Agriannual 2007.** Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, Instituto FNP. Consultoria & AgroInformativos, 520 p.
- Almeida, J.E.M., A. Batista Filho, C. Lamas, L.G. Leite, M. Trama & A.H. Sano. 2003.** Avaliação da compatibilidade de defensivos agrícolas na conservação de microrganismos entomopatogênicos no manejo de pragas do cafeeiro. Arq. Inst. Biol. 70: 79-84.
- Alves, A.M.A., J.H.R. Santos, J.F.Alves & J.P. Oliveira. 1987.** Controladores naturais da lagarta do cartucho do milho no Estado do Ceará. Ciên. Agron. 18: 35-39.
- Alves, S. B. 1998.** Fungos Entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998.** Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, p. 217-238. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Batista Filho, A, J.E.M. Almeida & C. Lamas. 2001.** Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotrop.Entomol. 30: 437-447.
- Blanford, S. & M.B. Thomas. 2001.** Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridium*. J. Invertebr. Pathol. 78: 1-8.
- Coelho, M.C.F. & F.H. França. 1987.** Biologia, quetotaxia da larva e descrição do adulto da traça do tomateiro. Pesqu. Agropecu. Bras. 22: 129-135.
- Destéfano, R.H.R., S.A.L. Destéfano & C.L.M. 2004.** Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. Gen. Mol. Biol. 27: 245-252.

- França, F.H. & M. Castelo Branco. 1992.** Ocorrência da traça do tomateiro (*Scrobipalpuloides absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil. Horticult. Bras. 10: 6-10.
- Giustolin, T.A.; J.D. Vendramim, S.B. Alves & S.A. Vieira. 2001.** Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. Neotrop. Entomol. 30: 417-421.
- Giustolin, T.A.; J.D. Vendramim & J.R.P. Parra. 2002.** Número de instares larvais de *Tuta absoluta* (Meyrick) em genótipos de tomateiro. Sci. Agric. 59: 393-396.
- Grimm, C. 2001.** Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. Crop. Prot. 20: 623-630.
- Haji, F.N.P., J.R.P. Parra, J.P. Silva & J.G.S. Batista. 1988.** Biologia da traça do tomateiro sob condições de laboratório. Pesqui. Agropecu. Bras. 23: 107-110.
- Hora, R. C. & J.U.T. Brandão Filho. 2004.** O lugar especial de produção de hortaliças no agronegócio, p.322-323. In Agriannual: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP 496p.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2007.** Levantamento sistemático de produção agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: dez. 2007.
- Lezama-Gutiérrez, R., J.J. Hamm, J. Molina-Ochoa, M. López-Edwards, A. Pescador-Rubio, M. González-Ramírez & E.L. Styer. 2000.** Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. Fla. Entomol. 84: 23-30.
- Loureiro, E.S., A. Moino Jr., A. Arnosti & G.C. Souza. 2002.** Effect of chemical products used in lettuce and chrysanthemum on entomopathogenic fungi. Neotrop. Entomol. 31: 263-269.

- Luz, J.M.Q., A.V. Shinzato & M.A.D. Silva. 2007.** Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. *Biosci. J.* 23: 7-15.
- Medeiros, M.A., G.L. Villas Bôas, O.A. Carrijo, N. Makishima & N.J. Vilela. 2005.** Manejo Integrado da Traça-do-tomateiro em ambiente protegido, EMBRAPA, Brasília, Circular Técnica, 10p.
- Melo, P.C.T & N.J. Vilela. 2004.** Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na década de 90. *Hortic. Bras.* 22: 154-160.
- Neves, P.M.O.J. & S.B. Alves. 2004.** External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Neotrop. Entomol.* 33: 51-56.
- Neves, P.M.O.J., E. Hirose, P.T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotrop. Entomol.* 30: 263-268.
- Oppenheim, S. 2001.** Alternative Agriculture in Cuba. *Am. Entomol.* 47: 216-227.
- Pires, L.M. & I.M.R. Marques. 2002.** Aspectos biológicos da traça do tomateiro e armazenamento de seus ovos e pupas em baixas temperaturas. *Rev. Agric.* 77: 357-367.
- Quesada-Moraga, E., A. Ruiz-García & C. Santiago-Álvarez. 2006.** Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 1955-1966.
- Rampelotti, F.T., A. Ferreira, H.F. Prando, A.D. Grützmacher, J.F. da S. Martins, F.A. Tcacenco & M.L.T. Mattos. 2007.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arq. Inst. Biol.* 74: 141-148.

- Rodriguez, M.S., M. P. Gerding & A. France. 2006a.** Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. Téc. 66: 151-158.
- Rodriguez, M.S., M. P. Gerding & A. France. 2006b.** Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. Téc. 66: 159-165.
- Samuels, R.I., D.L.A. Coracini, C.A.M. Santos & C.A.T. Gava. 2002.** Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera : Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Biol. Control 23: 269-273.
- Souza, J.C. & P.R Reis. 1992.** Traça-do-tomateiro, histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte, EPAMIG, Boletim Técnico, n. 32, 19p.
- Tanzini, M.R., S.B. Alves & A. Stten. 2002.** Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomopatogênicos. Arq. Inst. Biol. 69: 65-69.
- Ullé, J.A. & O. Nakano. 1994.** Avaliação do dano de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae) em plantas de tomateiro com diferentes níveis de infestação. An. Soc. Entomol. Bras. 23: 155-160.
- Vandenberg, J.D., A.M. Shelton, W.T. Wilsey & M. Ramos. 1998.** Assesment of *Beauveria bassiana* sprays for control of Diamondback Moth (Lepidoptera:Plutellidae) on crucifers. J. Econ. Entomol. 91: 624-630.
- Villas Bôas, G.L., M. Castelo Branco & M.A. Medeiros. 2005.** Novas formas de manejo integrado da Traça-do-Tomateiro. Comunicado Técnico, EMBRAPA, n. 99, Brasília, DF, 5p.

CAPÍTULO 2

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) E COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS

LAURICÍ M. PIRES¹, EDMILSON J. MARQUES¹, JOSÉ V. DE OLIVEIRA¹ E SÉRGIO B. ALVES²

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

²Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, C. Postal 9,
13418-900, Piracicaba, SP.

¹Pires, L.M., E.J. Marques, J.V. de Oliveira & S.B. Alves. Fungos Entomopatogênicos para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e compatibilidade com inseticidas. Neotropical Entomology.

RESUMO – Avaliou-se a patogenicidade dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok.(URPE-6, URPE-19, E9, PL47 e PL43) e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (CPATC 053, CPATC 057, ESALQ 900, ESALQ 447 e CG 001) sobre ovos e lagartas de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae). Os resultados evidenciaram que os isolados foram patogênicos às respectivas fases de desenvolvimento do inseto. Entretanto, os ovos foram mais susceptíveis do que as lagartas de primeiro ínstar. O isolado URPE-6 de *M. anisopliae* foi mais patogênico para ovos, causando 95% de infecção, com CL_{50} de $3,5 \times 10^4$ conídios mL^{-1} . Para as lagartas, o isolado URPE-19 foi mais patogênico, causando uma mortalidade de 42%. A compatibilidade desses isolados com os inseticidas Clorfenapir, Espinosade, Indoxacarbe, Abamectina e Nim foi avaliada em três concentrações (CM = concentração média recomendada, 0,5.CM e 0,25.CM), sendo avaliado o efeito sobre a germinação dos conídios, o crescimento vegetativo e conidiogênese. Os inseticidas não afetaram a germinação dos conídios. Com relação ao crescimento vegetativo e conidiogênese foram observadas diferentes respostas de acordo com as concentrações e inseticidas utilizados. Na maioria dos casos, os inseticidas foram compatíveis com os patógenos nas concentrações testadas. Espinosade e Indoxacarbe apresentaram os melhores resultados, sendo compatíveis com os dois isolados em todas as concentrações. A utilização de entomopatógenos pode ser uma alternativa de controle para *T. absoluta*. Além disso, quando associados a inseticidas compatíveis podem vir a aumentar sua eficiência contribuindo para uma diminuição do uso destes produtos no ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Traça do tomateiro, Manejo Integrado de Pragas, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, compatibilidade

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI TOWARDS *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA:
GELECHIIDAE) AND THEIR COMPATIBILITY WITH INSECTICIDES

ABSTRACT – The effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill towards eggs and larvae of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) was evaluated. The results showed that the isolates were pathogenic to these developmental phases of the insect, however eggs were more susceptible than 1st-instar larvae. Among the isolates, the URPE-6 isolate of *M. anisopliae* caused 95% infection on eggs as the most pathogenic isolate. CL₅₀ for egg inviability was 3,5x10⁴ conidia mL⁻¹. The URPE-19 isolate was more pathogenic towards larvae, causing 42% mortality. The compatibility of these isolates with the insecticides Chlorfenapyr, Spinosad, Indoxacarb, Abamectin, and Neem were evaluated with three different concentrations (CM = average recommendation for field, 0.5·CM and 0.25·CM), regarding the effect on conidia germination, vegetative growth, and conidiogenesis. The insecticides had no effect on conidia germination. Regarding the vegetative growth and conidiogenesis, different responses were observed depending on the insecticide concentration used. In most treatments, the insecticides were compatible with the entomopathogens through all the concentrations. Spinosad and indoxacarb showed the best results, being compatible with the two *M. anisopliae* isolates across the concentrations. The use of entomopathogenic fungi is a promising alternative control against *T. absoluta*. Moreover, when associated with compatible insecticides, they may increase control efficacy in field contributing to decrease the use of these products in the environment.

KEY WORDS: Tomato leafminer, Integrated Pest Management, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, compatibility

Introdução

Um dos fatores limitantes da produtividade da cultura do tomate é a ocorrência de pragas, destacando-se dentre essas a traça do tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae), praga chave nas principais regiões produtoras do Brasil (Picanço *et al.* 1997, Picanço *et al.* 1998). As lagartas penetram nas folhas 20 a 45 minutos após a eclosão alimentando-se do mesofilo foliar (Coelho & França 1987). Embora possuam hábito minador, movimentam-se sobre a haste principal das plantas, principalmente nas horas mais quentes do dia (Ullé & Nakano 1994). Nesta fase, apresentam grande consumo foliar diário, que cresce exponencialmente à medida que mudam de ínstar (Borgoni *et al.* 2003). Além de causar injúrias nas folhas, também atacam as brotações apicais e frutos, depreciando-os para comercialização, podendo em alguns casos causar a morte do tomateiro (Michereff Filho & Vilela 2001).

Em geral, os produtores de tomate utilizam quantidades excessivas de defensivos agrícolas para o controle de pragas e doenças, como forma de garantir melhor a produtividade (Teixeira *et al.* 2005). Esta prática promove a contaminação ambiental, traz danos à saúde do trabalhador e consumidores do produto agrícola, afeta a ação de inimigos naturais (Carvalho *et al.* 2003, Castelo Branco *et al.* 2003), além de proporcionar a seleção de populações resistentes (Siqueira 2000, Castelo Branco *et al.* 2001).

O manejo dessa praga com a utilização de fungos entomopatogênicos foi estudado por Giustolim *et al.* (2001) que avaliaram a patogenicidade de *B. bassiana* para lagartas de *T. absoluta* obtendo mortalidade variando entre 50,8 e 43,3% para lagartas do primeiro e quarto ínstar, respectivamente. Isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, nativos da região do Chile, também foram testados para o controle de ovos e lagartas desta praga. Observou-se uma variabilidade nos níveis de susceptibilidade dos ovos aos isolados testados, sendo os mais patogênicos Qu-B912 (*B. bassiana*) e Qu-M558 (*M. anisopliae*) que apresentaram porcentagens

de mortalidade de 60 e 80%, respectivamente (Rodriguez *et al.* 2006a). Esses mesmos isolados foram testados sobre lagartas de terceiro ínstar de *T. absoluta*, na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, obtendo-se mortalidade de 95% para o isolado Qu-B912 e 92% para Qu-M558, 10 dias após a inoculação (Rodriguez *et al.* 2006b).

As interações entre os fungos entomopatogênicos e inseticidas devem ser consideradas em programas de manejo integrado. Estas interações podem ser positivas, quando ocorre uma ação sinérgica entre o patógeno e o produto, ou negativas, quando ocorre a inibição de um dos componentes, geralmente o patógeno. Além disto, a conservação dos fungos entomopatogênicos dentro do agroecossistema é considerada a estratégia mais simples e econômica de utilização destes microrganismos, através do emprego de inseticidas seletivos (Silva *et al.* 2005).

O efeito de inseticidas sobre fungos varia amplamente de acordo com a espécie e linhagem do patógeno e das concentrações utilizadas (Alves *et al.* 1998), além disso, diferentes tipos de formulações também podem causar variações sobre a germinação e desenvolvimento dos patógenos (Batista Filho *et al.* 2001). Estudando o efeito tóxico de oito inseticidas sobre *B. bassiana* (CG 425), Oliveira *et al.* (2002) observaram que apenas três dos produtos testados foram compatíveis com o isolado estudado, sendo recomendados em programas de manejo integrado de *Hypothenemus hampei* (Ferrari), contribuindo para a conservação do patógeno no ambiente. Neves *et al.* (2001) estudando a ação de inseticidas neonicotinóides sobre *B. bassiana* (447), *M. anisopliae* (E9) e *Paecilomyces* sp. Bainier (CNPSO P77), não verificaram efeitos negativos das formulações testadas sobre os patógenos. Silva *et al.* (2006) pesquisaram o efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre os fungos *B. bassiana* (CG432), *M. anisopliae* (UEL50) e *Paecilomyces* sp. (UNI31), observando uma variação na ação dos produtos sobre a germinação dos diferentes isolados.

O efeito de defensivos químicos sobre fungos varia amplamente de acordo com a espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas (Alves *et al.* 1998). Diferentes tipos de formulações também podem causar variações sobre a germinação e desenvolvimento dos patógenos (Batista Filho *et al.* 2001). Desta forma, o conhecimento da interação entre produtos fitossanitários e patógenos que apresentam potencial para controle de uma determinada praga, representa uma importante ferramenta em programas de manejo integrado.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para ovos e lagartas de *T. absoluta*, bem como estudar a compatibilidade desses patógenos com inseticidas utilizados no controle deste inseto.

Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Criação do inseto em laboratório. Durante a realização dos experimentos foi mantida uma criação de *T. absoluta* no laboratório a uma temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 70 ± 10 de U.R. e fotofase de 12 horas, sendo os insetos provenientes de plantios comerciais localizados em Camocim de São Félix-PE. Para alimentação das lagartas, foram cultivadas plantas de tomate var. Santa Clara em sacos plásticos com capacidade de 5 kg, contendo solo esterilizado com adubação natural na proporção de 3:1, mantidos em casa de vegetação. Os adultos foram mantidos em gaiola telada medindo 58 cm de altura x 37 cm de comprimento x 49,5 cm de largura, sendo alimentados com solução açucarada a 10%. Para obtenção de posturas foram oferecidas folhas de tomateiro com o pecíolo imerso em recipientes com água. Após a eclosão, as lagartas foram alimentadas com folhas, substituídas sempre que necessário. À medida que iniciavam a pupação, as folhas secas

contendo as pupas foram transferidas para a gaiola de criação de adultos, reiniciando o ciclo de criação da praga.

Preparação de isolados dos fungos para realização dos bioensaios. Foram testados isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* provenientes da micoteca do laboratório de Patologia de Insetos da UFRPE, da ESALQ, CENARGEN e Embrapa Tabuleiros Costeiros (Tabela 1). Os isolados foram armazenados a $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ em tubos de vidro com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de streptomicina (BDA + A) e óleo Nujol[®] esterilizados. Por ocasião dos experimentos, estes foram repicados para placas de Petri contendo BDA + A. Para realização dos bioensaios, os fungos foram multiplicados em meio completo (MC) constando basicamente de extrato de levedura, sais minerais, agar e água. A avaliação da viabilidade dos conídios foi determinada através da contagem dos germinados e não germinados, em microscópio óptico, 24 horas após o plaqueamento em BDA + A, sendo observados 100 conídios por placa para obtenção da porcentagem de germinação.

Testes de patogenicidade sobre ovos de *T. absoluta*. Utilizaram-se os isolados constantes da Tabela 1 com cinco repetições, sendo cada repetição composta por 20 ovos com idade de 0 a 24 horas. As suspensões foram preparadas a partir de placas cheias das culturas dos entomopatógenos adicionando-se 15 mL de água destilada e esterilizada com espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% (ADE + E) e retirando-se as estruturas dos fungos com o auxílio de uma espátula. A suspensão foi ajustada para 10^7 conídios mL^{-1} , com o auxílio da câmara de Neubauer. Folhas contendo ovos da traça do tomateiro foram pulverizadas, com 2 ml da suspensão, com o auxílio de um microatomizador “Paasche Airbusch” elétrico, acoplado a um compressor com 15 libras de pressão, sendo a testemunha pulverizada apenas com água destilada e espalhante adesivo. Após a aplicação, os ovos foram transferidos para recipientes de acrílico medindo 4,0 cm de diâmetro, forrados com papel filtro umedecido com água destilada. Os tratamentos foram

acondicionados em B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR, sendo efetuadas avaliações diárias, durante o período de 10 dias, para observação da viabilidade dos ovos, desenvolvimento dos fungos sobre os mesmos e verificação de possíveis efeitos sobre as lagartas que eclodiram durante o período mencionado.

Teste de patogenicidade sobre lagartas. Testou-se o efeito de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Tabela 1) sobre lagartas de primeiro ínstar de *T. absoluta*. Para tanto, folhas de tomateiro foram pulverizadas com as suspensões fúngicas na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} e infestadas em seguida com lagartas de *T. absoluta*. A testemunha foi pulverizada apenas com água destilada e espalhante adesivo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições, sendo cada uma composta por um folíolo contendo 10 lagartas. O pecíolo de cada folíolo foi envolvido com algodão umedecido em água destilada e acondicionado em recipientes plásticos 7,5 cm de diâmetro e 4,5 cm de altura, forrados com papel filtro. Os tratamentos foram mantidos em B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR, sendo as avaliações efetuadas diariamente, até o fim do período de desenvolvimento das lagartas para observação da mortalidade. Os insetos mortos foram colocados em câmara úmida para confirmação do agente causal.

Determinação da concentração letal (CL_{50}) de *M. anisopliae* sobre ovos de *T. absoluta*. Foram utilizadas suspensões do isolado URPE-6 nas concentrações de 10^4 , 3×10^4 , 6×10^4 , 10^5 e 10^6 conídios mL^{-1} . Os procedimentos quanto a forma de aplicação e acomodação dos ovos foi o mesmo adotado no teste de patogenicidade sobre ovos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constando dos tratamentos correspondentes às diferentes concentrações das suspensões do patógeno, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 20 ovos com idade de 0 a 24 horas. Os tratamentos foram acondicionados em B.O.D. a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm$

10% UR, sendo as avaliações diárias, para observação da viabilidade dos ovos e desenvolvimento dos fungos sobre os mesmos.

Compatibilidade de *M. anisopliae* a inseticidas. Testou-se o efeito de inseticidas (Tabela 2) sobre os isolados URPE-6 e URPE-19 de *M. anisopliae*. Foram avaliadas três concentrações para cada produto: concentração média recomendada para campo (CM=1x), metade da CM (0,5x) e um quarto da CM (0,25x). Os testes foram conduzidos *in vitro* em meio BDA+A, acrescentando-se os produtos ao meio de cultura ainda líquido ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, os entomopatógenos foram inoculados com auxílio de alça de platina em três pontos equidistantes por placa, sendo preparadas três placas por tratamento, totalizando nove colônias. Em seguida, as placas foram mantidas em BOD a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ U.R. e fotofase de 12 horas, durante 14 dias. Em seguida, foram avaliados o crescimento vegetativo e o número de conídios produzidos. O crescimento vegetativo foi determinado medindo-se os diâmetros de seis colônias, selecionadas aleatoriamente, em dois sentidos ortogonais na superfície do meio de cultura. Para avaliação do número de conídios, as colônias foram recortadas e transferidas individualmente para beckers com capacidade para 50mL, contendo água destilada esterilizada e espalhante adesivo Tween 80 a 0,01%, passando-se por agitador tipo Vortex (1 minuto) para remoção dos conídios. Após as diluições necessárias, fez-se a contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Para os testes de germinação, os inseticidas, nas concentrações preestabelecidas, foram misturadas em 10 mL de ADE + E e 1 mL da suspensão de conídios padronizada em 10^7 conídios mL^{-1} . Decorridos 60 minutos, alíquotas de 0,1 mL foram espalhadas, com o auxílio da alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA + A. Na testemunha utilizou-se a suspensão do fungo diluída em ADE+E. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições (placas). Após 20 horas avaliou-se a viabilidade, dividindo-se as placas em quatro quadrantes, quantificando-se os conídios germinados e não germinados (100 conídios/quadrante),

sob microscópio óptico. A classificação toxicológica foi realizada considerando-se os valores médios de porcentagem de esporulação, crescimento vegetativo e germinação dos fungos, calculando-se as porcentagens em relação à testemunha (100%) e aplicando-se para cada produto estudado, o modelo proposto por Alves *et al.* (2007), de acordo com a seguinte fórmula: $IB = 47(CV) + 43(ESP) + 10(GERM)/100$, sendo IB, índice biológico; CV, porcentagem de crescimento vegetativo em relação à testemunha; ESP, porcentagem de esporulação das colônias em relação à testemunha; GER, porcentagem de germinação dos conídios.

Os valores de IB para a classificação dos produtos são: tóxico de 0-41, moderadamente tóxico de 42 a 66 e compatível > 66.

Análises estatísticas. As médias relacionadas aos dados obtidos nos testes de patogenicidade e compatibilidade dos entomopatógenos com os inseticidas testados foram transformadas para raiz de $(x + 0,5)$ submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo da CL_{50} , os dados de mortalidade obtidos nas diferentes concentrações foram submetidos à análise de Probit. Para todas as análises utilizou-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e Discussão

Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram patogenicidade para ovos de *T. absoluta*, sendo observadas porcentagens de infecção que variaram de 12 a 95%. Destacou-se o isolado URPE-6 de *M. anisopliae* diferindo dos demais tratamentos com apenas 5% de eclosão das lagartas (Tabela 3), havendo ocorrência de conidiogênese em todos os ovos que não proporcionaram a eclosão de lagartas. Os isolados E9 de *M. anisopliae* e CPATC 053 de *B. bassiana* não apresentaram diferenças estatísticas nas porcentagens de infecção dos ovos que foi acima de 50%. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodriguez *et al.* (2006a) que

observaram porcentagens de infecção de 80% para ovos de *T. absoluta* tratados com *M. anisopliae* isolado Qu-M558.

As diferenças nos graus de patogenicidade de isolados pertencentes a uma mesma espécie de fungo podem ocorrer devido a variações genéticas e especificidade a um determinado hospedeiro (Alves 1998). Alguns trabalhos sugerem que as interações entre o agente de controle biológico e o hospedeiro determinam a especificidade e virulência do entomopatógeno sobre o inseto. Assim, observou-se em testes de patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* sobre *Tibraca limbativentris* Stal que os melhores resultados foram obtidos para aqueles provenientes deste mesmo inseto evidenciando a relação entre o patógeno e o hospedeiro (Rampelotti *et al.* 2007). Todavia, outros estudos indicam que isolados procedentes de uma dada espécie de inseto mostram diferenças quanto a patogenicidade para esta mesma espécie em testes de laboratório (Berretta *et al.* 1998). Este fato foi evidenciado por Loureiro *et al.* (2005) que testando o potencial de *M. anisopliae* sobre *Mahanarva fimbriolata* (Stal) observaram variabilidade nos resultados, atribuindo este fato à variabilidade genética de cada isolado, independente de seu hospedeiro e local de origem. Estes dados estão de acordo com os resultados dessa pesquisa, uma vez que, os isolados URPE-6 e E9 procedentes de *M. posticata*, apresentaram os melhores resultados.

Além do efeito ovicida, também houve mortalidade de lagartas de primeiro ínstar provenientes dos ovos tratados, não ocorrendo diferenças para nenhum dos isolados testados. Apesar dos baixos valores obtidos para este parâmetro, este fato contribuiu para uma elevação na proporção final de infecção dos ovos e lagartas quando analisados em conjunto (Tabela 3). Rodrigues-Rueda & Fargues (1980) verificaram que a infecção por *Paecilomyces fumosoroseus* Apoka e *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em lagartas recém-eclodidas de *Mamestra brassicae* L. e *Spodoptera littoralis* (Boisduval) provenientes de ovos tratados, é causada pela penetração do

fungo no tegumento do ovo antes da eclosão ou pelo contato com conídios sobre o córion do ovo, servindo como inóculo quando a larva alimenta-se do córion.

As lagartas de primeiro ínstar de *T. absoluta*, quando tratadas por *M. anisopliae* e *B. bassiana*, apresentaram mortalidade total até 56%. O isolado URPE-19 foi o mais patogênico com mortalidade total e confirmada de 56 e 42%, respectivamente, não diferindo dos isolados E9, PL43, URPE-6 de *M. anisopliae* e CPATC 053 de *B. bassiana*, que causaram mortalidade total entre 31 e 46% (Tabela 4). O fato de algumas lagartas não apresentarem esporulação não descarta totalmente a possibilidade de terem sido mortas pelos fungos. Eventuais fissuras no tegumento, provocadas pela manipulação durante a transferência destes cadáveres para a câmara úmida, por exemplo, podem contribuir para uma ação rápida de bactérias decompositoras sobre os cadáveres, impedindo a esporulação do fungo sobre ele (Tamai *et al.* 2002).

Houve uma variação no grau de patogenicidade dos isolados com relação aos diferentes estágios de desenvolvimento de *T. absoluta*, sendo o isolado URPE-6 mais patogênico aos ovos e o isolado URPE-19 às lagartas. Resultados semelhantes foram observados por Rodríguez-Rueda & Fargues (1980) onde relataram diferenças na patogenicidade de um mesmo isolado de *N. rileyi* para ovos e lagartas de *S. littoralis*, sendo este fungo mais patogênico às lagartas de primeiro ínstar. Rampelotti *et al.* (2007) também observaram que o isolado CG891 de *M. anisopliae* proporcionou uma maior patogenicidade à ovos de *T. limbativentris* do que a ninfas e adultos.

O isolado URPE-6 apresentou uma elevada patogenicidade para ovos de *T. absoluta*. A análise de Probit mostrou que a CL_{50} obtida para este isolado foi de $3,5 \times 10^4$ conídios mL^{-1} com intervalos entre $2,96 \times 10^4$ e $4,10 \times 10^4$ (Tabela 5), sendo este dado menor do que o observado por Rodríguez *et al.* (2006a) que, avaliando a virulência de *M. anisopliae* sobre ovos de *T. absoluta*, obteve CL_{50} de 10^7 conídios mL^{-1} para o isolado Qu-M558, considerado o isolado mais virulento de seus estudos.

Com relação aos resultados obtidos nessa pesquisa, a respeito da compatibilidade dos isolados URPE-6 e URPE-19 de *M. anisopliae* com inseticidas utilizados para o controle de *T. absoluta* observou-se que houve uma variação entre os parâmetros estudados para cada isolado, dependendo do produto e concentração utilizada.

A germinação de conídios dos isolados URPE-6 e URPE-19 não foi afetada pelos inseticidas testados nas concentrações estudadas (Tabelas 6 e 7). A viabilidade de conídios dos fungos entomopatogênicos é tida por alguns autores como um dos parâmetros que mais deve ser considerado em relação à compatibilidade com produtos químicos em condições de campo (Hirose *et al.* 2001, Neves *et al.* 2001). Pois, para causar a doença é necessário que o conídio germine e penetre na cutícula do inseto. O conídio também representa a permanência do inoculo no campo, que em condições favoráveis pode germinar e iniciar o primeiro foco da doença (Alves & Leucona 1998). Assim, se ocorrer inibição da germinação a eficiência de controle será comprometida, seja em aplicações inundativas ou se o fungo estiver naturalmente presente no agroecossistema e entrar em contato com o produto (Silva *et al.* 2005).

Com relação ao crescimento vegetativo e conidiogênese dos isolados URPE-6 e URPE-19, foram observadas diferentes respostas aos inseticidas testados nas três concentrações, nem sempre havendo uma correlação positiva entre estes dois parâmetros.

Os resultados referentes ao crescimento vegetativo mostram que não houve efeito inibitório dos inseticidas Clorfenapir em todas as concentrações testadas, Indoxacarbe (0,25x) e Espinosade (0,25x), sobre o isolado URPE-6, sendo as médias semelhantes às da testemunha, embora, estes tratamentos não tenham diferido entre os de Indoxacarbe e Espinosade nas demais concentrações estudadas. Abamectina causou as maiores reduções nos diâmetros das colônias em todas as concentrações, com valores variando de 13,5 a 22% (Tabela 6). Para o isolado URPE-19, apenas Espinosade em todas as concentrações não proporcionou reduções nos diâmetros das colônias. Os

demais tratamentos diferiram da testemunha, sendo Clorfenapir (1x) o que causou maior efeito no crescimento vegetativo com redução de 23,08% (Tabela 7).

A conidiogênese do isolado URPE-6 não foi afetada por Indoxacarbe (0,25x), e Espinosade (0,25x e 0,5x). As reduções mais significativas ocorreram nos tratamentos Abamectina, Nim e Clorfenapir em todas as concentrações utilizadas, embora este último não tenha afetado o crescimento vegetativo do isolado URPE-6 (Tabela 6). Com relação ao isolado URPE-19, a conidiogênese não foi afetada pelo Clorfenapir (0,25x), sendo este o único tratamento que não diferiu da testemunha. Também não diferiram deste, os tratamentos Indoxacarbe (0,25) e Espinosade (0,25x e 1x). O menor número de conídios foi observado para Clorfenapir (1x) que provocou uma redução de 89,40%, seguidos de Nim (0,50x e 1x) e Espinosade (1x), que não havia afetado o crescimento vegetativo (Tabela 7).

Em todos os tratamentos o crescimento vegetativo foi menos afetado do que a conidiogênese. Não ocorreu uma relação diretamente proporcional entre estes dois parâmetros para alguns tratamentos, fato também relatado em outros trabalhos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e agrotóxicos. Estes demonstraram que nem sempre um aumento no diâmetro da colônia corresponde a um aumento no número de conídios e vice-versa (Batista Filho *et al.* 2001, Neves *et al.* 2001, Loureiro *et al.* 2002).

Estudos de compatibilidade com testes *in vitro* apresentam a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre no ambiente, onde vários fatores atuam minimizando esta exposição. Assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, não há dúvidas sobre a sua seletividade em condições de campo (Alves *et al.* 1998). Os parâmetros avaliados nestes estudos como a germinação de conídios, crescimento vegetativo e conidiogênese, simulam as fases de desenvolvimento do patógeno sobre o hospedeiro no ambiente. Considerando o inseto, a germinação e a conidiogênese são as fases de desenvolvimento

do fungo que estarão em contato direto com os inseticidas utilizados. O crescimento vegetativo do patógeno ocorrerá, ou será iniciado apenas dentro do hospedeiro, onde provavelmente as concentrações dos inseticidas são menores do que nos testes usados *in vitro*, que representam uma forma mais drástica do que acontece com o crescimento vegetativo do patógeno (Neves *et al.* 2001, Silva *et al.* 2005).

Para a classificação da toxicidade dos inseticidas a fungos entomopatogênicos, Alves *et al.* (1998) propuseram um modelo matemático considerando apenas o crescimento vegetativo e esporulação. Atualmente, este modelo foi reavaliado, sendo considerado também a germinação de conídios (Alves *et al.* 2007). De acordo com esta classificação, para o isolado URPE-6 de *M. anisopliae*, apenas os inseticidas Abamectina (0,5x e 1x) e Nim (0,5x e 1x) foram considerados tóxicos. Para o isolado URPE-19 todos os inseticidas foram classificados como compatíveis, exceto Clorfenapir e Nim, apenas na concentração mais elevada (Tabela 8).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que Abamectina foi tóxico apenas para o isolado URPE-6, enquanto que Clorfenapir apenas ao isolado URPE-19. Dos inseticidas utilizados, apenas o Nim (1x) foi tóxico aos dois isolados de *M. anisopliae*. Pesquisas realizadas por Marques *et al.* (2004), verificando o efeito do óleo de Nim na formulação Nim-I-Go, observaram que este produto reduziu o crescimento vegetativo e esporulação do isolado E9 de *M. anisopliae*, em concentrações que variaram de 5% (concentração inicial) a 1/256 da concentração inicial, embora não tenha afetado a viabilidade. Hirose *et al.* (2001) verificaram que o óleo de nim na concentração de 2% afetou o crescimento vegetativo, esporulação e germinação de conídios do isolado CB 38 de *M. anisopliae*, sendo classificado como muito tóxico. O inseticida Abamectina (0,5 e 1x) apresentou toxicidade apenas ao isolado URPE-6. Pesquisas realizadas utilizando a mesma formulação indicaram ser este produto compatível aos isolados de *M. anisopliae* CB 121 (Loureiro *et al.* 2002) e E9 (Oliveira *et al.* 2002), nas concentrações recomendadas pelo fabricante

e na metade desta, respectivamente. Clorfenapir foi compatível com os dois isolados, sendo tóxico apenas na maior concentração para o isolado URPE-19. Esse mesmo produto na formulação Citrex 5C, foi considerado tóxico na concentração recomendada afetando a germinação de *M. anisopliae* em 44, 33% (Oliveira *et al.* 2002).

O desenvolvimento de estudos sobre novas estratégias de controle que possam complementar o Manejo Integrado de *T. absoluta* torna-se importante, pois podem contribuir para diminuição da aplicação de inseticidas na cultura do tomate. Boiça Jr. *et al.* (2007) observaram em seus estudos, comparando diferentes táticas de controle de pragas tardias em cultivares de tomateiro de crescimento indeterminado, que as táticas de manejo integrado foram eficientes promovendo uma redução do número de pulverizações em até 77% e um incremento na produção de até 74%.

A utilização de entomopatógenos representa uma alternativa de controle em potencial, tendo sido observado que *M. anisopliae* é promissor para o controle de *T. absoluta*, principalmente no estágio de ovo, sendo mais uma estratégia para o manejo integrado dessa praga. A associação deste entomopatógeno com inseticidas compatíveis pode vir a aumentar sua eficiência contribuindo para uma redução do uso de inseticidas no ambiente.

Agradecimentos

A Marcelo Picanço (UFV) pela orientação na escolha e envio dos inseticidas utilizados na pesquisa. À CAPES pelo apoio financeiro.

Literatura Citada

- Alves, S.B. & R.E. Leucona. 1998.** Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p.97-163. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B., M.L. Haddad, M. Faion, G.C. de Baptista & L.S. Rossi-Zalaf. 2007.** Novo índice para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: X SICONBIOL, 2007, Brasília. Anais... do X Siconbiol, 2007. ID-286. Cd-rom.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos Entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998.** Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, p. 217-238. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Batista Filho, A., J.E.M. Almeida & C. Lamas. 2001.** Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotrop. Entomol. 30: 437-447.
- Berretta, M.F., R.E. Lecuona, R.O. Zandomeni & O. Grau. 1998.** Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. J. Invertebr. Pathol. 71: 145-150.
- Boiça Jr., A. Leal., M.A.A. Macedo, A.L. Torres & M.R. Angelini. 2007.** Late pest control in determinate tomato cultivars. Sci. Agric. 64: 589-594.
- Borgoni, P.C., R.A. da Silva & G.S. Carvalho. 2003.** Consumo do mesofilo foliar de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1971) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. Rev. Centr. Cienc. Rural 33: 7-11

Carvalho, G.A., L.C. Fuini, L.C.D. Rocha, P.R. Reis, J.C. Moraes & C.C. Ecole. 2003.

Avaliação da seletividade de inseticidas utilizados na tomaticultura a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera:Trichogrammatidae). Rev. Ecosistema 28: 23-30.

Castelo Branco, M.; F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001. Uso de inseticidas para

o controle da traça-do-tomateiro e traça-das crucíferas: um estudo de caso. Hortic. Bras. 19: 60-63.

Castelo Branco, M., L.A. Pontes, P.S.T. Amaral & M.V. Mesquita Filho. 2003. Inseticidas

para o controle da traça-do-tomateiro e broca-grande e seu impacto sobre *Trichogramma pretiosum*. Hortic. Bras. 21: 652-654.

Coelho, M.C.F. & F.H. França. 1987. Biologia, quetotaxia da larva e descrição do adulto da

traça do tomateiro. Pesqu. Agropecu. Bras. 22: 129-135.

Giustolin, T.A.; J.D. Vendramim, S.B. Alves & S.A. Vieira. 2001. Patogenicidade de *Beauveria*

bassiana (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. Neotrop. Entomol. 30: 417-421.

Hirose, E., P.M.O.J. Neves, J.A.C. Zequi, L.H. Martins, C.H.Peralta & A. Moino Jr. 2001.

Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Braz. Arch. Biol. Technol. 44: 419 - 423.

Loureiro, E.S., A. Batista Filho, J.E.M. Almeida & L.G.A. Pessoa 2005. Seleção de isolados

de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin contra a cigarrinha da raiz da canade-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera:Cercopidae) em laboratório. Neotrop. Entomol. 34: 791-798.

Loureiro, E.S., A. Moino Jr., A. Arnosti & G.C. Souza. 2002. Effect of chemical products used

in lettuce and chrysanthemum on entomopathogenic fungi. Neotrop. Entomol. 31: 263-269.

- Marques, R.P., A.C. Monteiro & G.T. Pereira. 2004.** Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). Rev. Centr. Cienc. Rural 34: 1675-1680.
- Michereff Filho, M. & E.F. Vilela. 2001.** Traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), p. 81-84. In E.F. Vilela, R.A. Zucchi & F. Cantor (eds.), Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil. Ribeirão Preto, Holos, 173p.
- Neves, P.M.O.J., E. Hirose, P.T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides. Neotrop. Entomol. 30: 263-268.
- Oliveira, C.N. de, P.M.O.J. Neves, E.C. Guzzo & V.S. Alves. 2002.** Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com agroquímicos. Semina Ciênc. Agrar. 23: 211-216.
- Picanço, M., F.G. Faleiro, A. Pallini Filho & A.L. Matioli. 1997.** Perdas na produtividade do tomateiro em sistemas alternativos de controle fitossanitário. Hortic. Bras. 15: 88-91.
- Picanço, M., G.L.D. Leite, R.N.C. Guedes & E.A. Silva. 1998.** Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. Crop Prot. 17: 447-452.
- Rampelotti, F.T., A. Ferreira, H.F. Prando, A.D. Grützmacher, J.F. da S. Martins, F.A. Tcacenco & M.L.T. Mattos. 2007.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera:Pentatomidae) em condições de laboratório. Arq. Inst. Biol. 74: 141-148.
- Rodríguez, M.S., M. P. Gerding & A. France. 2006a.** Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. Téc. 66: 151-158.
- Rodríguez, M.S., M. P. Gerding & A. France. 2006b.** Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. Téc. 66: 159-165.

- Rodriguez-Rueda, D. & J. Fargues. 1980.** Pathogenicity of entomopathogenic hyphomycetes, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Nomuraea rileyi*, to eggs of noctuids, *Mamestra brassicae* and *Spodoptera littoralis*. . J. Invertebr. Pathol. 3: 399-408.
- SAS Institute (1999-2001).** SAS /STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Silva, R.Z. da, P.M.O.J. Neves & P.H. Santoro.2005.** Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. Semina Ciênc. Agrar. 26: 305-311.
- Siqueira H.A.A., R.N.C. Guedes & M.C. Picanço. 2000.** Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric. For. Entomol. 2: 147-153.
- Tamai, M.A., S.B. Alves, J.E.M. de Almeida & M. Faion. 2002.** Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Arq. Inst. Biol. 69: 77-84.
- Teixeira, C.A., A.F. de Lacerda Filho, S. Pereira, L.H. de Souza & J.R. Russo. 2005.** Balanço energético de uma cultura de tomate. Rev. bras. eng. agríc. ambient. 9: 429-432.
- Ullé, J.A. & O. Nakano. 1994.** Avaliação do dano de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae) em plantas de tomateiro com diferentes níveis de infestação. An. Soc. Entomol. Bras. 23: 155-160

Tabela 1. Origem e hospedeiros dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* que foram utilizados nos experimentos com *T. absoluta*.

Espécie	Isolado	Origem	Hospedeiro
<i>M. anisopliae</i>	PL 43	ESALQ-USP	<i>M. posticata</i>
<i>M. anisopliae</i>	PI 47	ESALQ-USP	<i>M. posticata</i>
<i>M. anisopliae</i>	ESALQ 9	ESALQ-USP	<i>M. posticata</i>
<i>M. anisopliae</i>	URPE 6	UFRPE	<i>M. posticata</i>
<i>M. anisopliae</i>	URPE19	UFRPE	Solo
<i>B. bassiana</i>	ESALQ 447	ESALQ-USP	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>B. bassiana</i>	ESALQ 900	ESALQ-USP	<i>Solenopsis saevissima</i>
<i>B. bassiana</i>	CPATC 053	CPATC- SE	<i>B. sophorae</i>
<i>B. bassiana</i>	CPATC 057	CPATC- SE	<i>Homalinotus coriaceus</i>
<i>B. bassiana</i>	CG 001	CENARGEN	<i>Deois flavopicta</i>

Tabela 2. Produtos químicos utilizados nos testes de compatibilidade com os isolados URPE-6 e URPE-19 de *M. anisopliae*.

Nome Comercial	Ingrediente ativo	Grupo químico	Concentração média (CM) ¹	Classe
Neemseto	Nim	Botânico	1 mL/L	Inseticida natural
Pirate SC	Clorfenapir	Pyrrol	37,5 mL/100L	Inseticida/Acaricida
Rumo WG	Indoxacarbe	Oxadiazina	16 g/100L	Inseticida
Tracer SC	Espinosade	Espinosina	112,5 mL/ha	Inseticida biológico
Vertimec 18 CE	Abamectina	Avermectina	100 mL/100L	Inseticida/Acaricida

¹CM – Média da concentração recomendada pelo fabricante

Tabela 3. Porcentagens de ovos infectados e de eclosão de lagartas de *T. absoluta* tratados com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹. Temp.: 26 ± 1°C, U.R: 70 ± 10%, fotofase: 12h.

Isolados	Infecção de ovos (%)	Eclosão de lagartas (%)	Infecção de lagartas ¹ (%)	Infecção de ovos+lagartas (%)
<i>M. anisopliae</i>				
URPE-6	95,0 ± 2,73a ²	5,0 ± 2,73e ²	3,0 ± 2,00a ²	98,0 ± 1,22a ²
E9	64,0 ± 2,91ab	36,0 ± 2,91d	8,0 ± 4,06a	72,0 ± 4,64ab
PI47	19,0 ± 1,87cd	81,0 ± 1,87ab	12,0 ± 2,55a	31,0 ± 4,00c
PL43	19,0 ± 1,87cd	63,0 ± 2,54bc	10,0 ± 2,74a	29,0 ± 3,32c
URPE-19	12,0 ± 2,00cd	77,0 ± 1,22ab	14,0 ± 1,87a	26,0 ± 2,45c

<i>B. bassiana</i>				
CPATC 053	57,0 ± 8,45b	43,0 ± 8,45cd	10,0 ± 1,58a	67,0 ± 8,60b
ESALQ 900	30,0 ± 3,16c	70,0 ± 3,16ab	6,0 ± 1,87a	36,0 ± 4,85c
ESALQ 447	27,0 ± 3,00cd	73,0 ± 3,00ab	10,0 ± 3,53a	37,0 ± 2,55c
CPATC 057	25,0 ± 4,74cd	75,0 ± 4,74ab	7,0 ± 1,22a	32,0 ± 4,06c
CG 001	17,0 ± 4,36cd	75,0 ± 6,89ab	9,0 ± 1,00a	26,0 ± 4,30c
Testemunha	-	93,0 ± 2,54a	-	-
	$F_{9,40} = 26,19^{<0,001}$	$F_{10,44} = 39,77^{<0,001}$	$F_{9,40} = 1,74^{=0,111}$	$F_{9,40} = 23,71^{<0,001}$

¹Porcentagem de lagartas eclodidas que foram contaminadas pelo fungo.

²Médias (± EP) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Porcentagem média (\pm EP) de mortalidade total e confirmada de lagartas de *T. absoluta* tratadas com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹ (26 \pm 1°C, 70 \pm 10%de UR e fotofase de 12h).

Isolados	Mortalidade total (%)	Mortalidade confirmada (%)
<i>M. anisopliae</i>		
URPE-19	56,0 \pm 3,71a ¹	42,0 \pm 6,29a ¹
E9	46,0 \pm 1,63ab	36,0 \pm 3,05ab
PI43	45,0 \pm 2,69ab	35,0 \pm 2,24ab
URPE-6	38,0 \pm 5,33abc	20,0 \pm 2,98bc
PL47	31,0 \pm 1,79bcd	22,0 \pm 1,33abc
<i>B. bassiana</i>		
CPATC 053	37,0 \pm 3,66abc	35,0 \pm 3,07ab
CG 001	32,0 \pm 2,90bcd	25,0 \pm 3,72abc
ESALQ 447	26,0 \pm 2,21cde	18,0 \pm 2,00c
CPATC 057	20,0 \pm 2,11de	13,0 \pm 1,53cd
ESALQ 900	14,0 \pm 1,63e	8,0 \pm 2,00d
Testemunha	7,0 \pm 3,00f	-
	F _{10,99} = 24,95 ^{<0,0001}	F _{9,90} = 11,10 ^{<0,0001}

¹Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Infecção de ovos de *T. absoluta* tratados com diferentes concentrações de *M. anisopliae* isolado URPE-6 em laboratório Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R: $70 \pm 10\%$, fotofase: 12h.

Concentrações (Conídios mL ⁻¹)	Infecção de ovos (%)	CL ₅₀ (Conídios mL ⁻¹) (IC) ¹	$\beta \pm \text{EP}^2$	χ^2
Testemunha	00,0 ± 0,00 d			
10 ⁴	13,7 ± 8,53cd			
3x10 ⁴	37,5 ± 22,17c	3,5 x 10 ⁴ (2,96 - 4,10)	2,26 ± 0,22	2,49
6x10 ⁴	70,0 ± 10,80b			
10 ⁵	87,5 ± 11,90ab			
10 ⁶	100,0 ± 0,00a			
C.V. (%)	27,75			

¹CL₅₀ = Concentração Letal (Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade).

² $\beta \pm \text{E.P}$ = Coeficiente angular da reta ± erro padrão.

Tabela 6. Efeito de três concentrações de inseticidas, sobre a germinação, crescimento vegetativo e número de conídios do isolado URPE-6 de *M. anisopliae*. Temp.: 26 ± 1°C, U.R: 70 ± 10%, fotofase: 12h.

Tratamentos		Germinação ²		Crescimento vegetativo ³		Número de conídios ³	
		(%)	redução (%)	(cm ²)	Redução (%)	(X x 10 ⁷)	Redução (%)
Testemunha	-	99,7 ± 0,10a ¹	0,00	5,4 ± 0,04a ¹	0,00	10,7 ± 0,36a ¹	0,00
Clorfenapir	0,25x ⁴	99,5 ± 0,21a	-0,18	5,3 ± 0,07ab	-2,04	3,5 ± 0,44d	-67,32
	0,5x	99,3 ± 0,05a	-0,43	5,2 ± 0,05ab	-2,22	3,2 ± 0,42d	-69,65
	1x	99,2 ± 0,10a	-0,51	5,2 ± 0,05ab	-3,52	3,3 ± 0,11d	-68,44
Espinosade	0,25x	99,6 ± 0,15a	-0,08	5,2 ± 0,04ab	-3,89	10,6 ± 0,64a	-1,31
	0,5x	99,3 ± 0,06a	-0,45	5,1 ± 0,04bc	-5,74	8,7 ± 0,55ab	-18,81
	1x	99,3 ± 0,06a	-0,45	5,0 ± 0,02bc	-7,4	6,1 ± 0,76bc	-43,02
Indoxacarbe	0,25x	99,7 ± 0,10a	0	5,2 ± 0,07ab	-2,96	10,7 ± 0,72a	-0,38
	0,5x	99,4 ± 0,15a	-0,35	5,1 ± 0,01bc	-5,74	4,0 ± 0,43cd	-62,57
	1x	99,3 ± 0,05a	-0,43	5,0 ± 0,03bc	-7,21	3,8 ± 0,16cd	-27,1
Abamectina	0,25x	99,5 ± 0,21a	-0,20	4,6 ± 0,05ef	-13,5	4,0 ± 0,25cd	-62,48
	0,5x	99,2 ± 0,35a	-0,51	4,4 ± 0,04f	-17,01	3,8 ± 0,42cd	-64,25
	1x	99,1 ± 0,23a	-0,64	4,2 ± 0,04g	-22,00	2,5 ± 0,26d	-76,36
Nim	0,25x	98,8 ± 0,33a	-0,89	4,8 ± 0,06cde	-9,399	4,4 ± 0,50cd	-58,38
	0,5x	99,5 ± 0,11a	-0,20	4,7 ± 0,09ed	-12,02	3,2 ± 0,33d	-70,21
	1x	98,9 ± 0,18a	-0,83	4,9 ± 0,04cde	-9,43	2,8 ± 0,53d	-73,65
		F _{15,48} = 2,11 ^{=0,02}		F _{15,80} = 34,42 ^{<0,0001}		F _{15,80} = 34,13 ^{<0,0001}	

¹Médias (± EP) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

² n = 4; ³ n = 6; ⁴x = Concentrações utilizadas

Tabela 7. Efeito de três concentrações de inseticidas, sobre a germinação, crescimento vegetativo e número de conídios do isolado

URPE-19 de *M. anisopliae* Temp.: 26 ± 1°C, U.R: 70 ± 10%, fotofase: 12h.

Tratamentos		Germinação ²		Crescimento vegetativo ³		Número de conídios ³	
		(%)	Redução (%)	(cm ²)	Redução (%)	(x10 ⁷)	Redução (%)
Testemunha	-	99,4 ± 0,18a	0,00	5,2 ± 0,04a	0,00	15,2 ± 1,23a	0,00
Clorfenapir	0,25x ⁴	98,9 ± 0,41a	-4,03	4,7 ± 0,04bcd	-8,47	12,5 ± 0,63ab	-17,57
	0,5x	99,1 ± 0,32a	-5,29	4,5 ± 0,08cdef	-12,50	7,0 ± 0,48fgh	-53,75
	1x	98,8 ± 0,15a	-5,42	4,0 ± 0,08g	-23,08	1,6 ± 0,19i	-89,40
Espinosade	0,25x	99,1 ± 0,26a	-0,32	5,0 ± 0,07ab	-2,70	9,9 ± 0,31bcd	-34,41
	0,5x	98,9 ± 0,25a	-0,51	5,1 ± 0,0a.	-0,40	9,7 ± 0,37bcde	-35,93
	1x	98,8 ± 0,21a	-0,63	4,9 ± 0,04abc	-5,77	5,2 ± 0,40h	-65,47
Indoxacarbe	0,25x	99,1 ± 0,29a	-0,32	4,5 ± 0,05def	-13,27	11,3 ± 0,65bc	-25,53
	0,5x	99,0 ± 0,11a	-0,38	4,6 ± 0,09cde	-11,16	8,8 ± 0,46cdef	-41,91
	1x	99,0 ± 0,32a	-0,44	4,6 ± 0,07cde	-11,16	7,2 ± 0,52efgh	-52,37
Abamectina	0,25x	99,1 ± 0,07a	-0,32	4,3 ± 0,07ef	-15,58	8,1 ± 0,43defg	-46,32
	0,5x	98,8 ± 0,11a	-0,63	4,5 ± 0,03cde	-12,31	6,3 ± 0,21gh	-44,94
	1x	98,7±0,15a	-0,67	4,4 ± 0,07def	-14,62	6,1 ± 0,45gh	-59,35
Nim	0,25x	98,7 ± 0,59a	-0,68	4,7 ± 0,10bc	-7,89	6,9 ± 0,75fgh	-54,41
	0,5x	98,6 ± 0,37a	-0,82	4,5 ± 0,11cdef	-12,50	5,3 ± 0,21h	-64,54
	1x	98,6 ± 0,48a	-0,76	4,2 ± 0,06fg	-18,47	5,2 ± 0,12h	-65,79
		F _{15,48} = 0,50 ^{=0,92}		F _{15,80} = 18,73 ^{<0,0001}		F _{15,80} = 46,68 ^{<0,0001}	

¹Médias (± EP) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

² n = 4; ³ n = 6; ⁴x = Concentrações utilizadas

Tabela 8. Classificação de inseticidas em relação à compatibilidade com os isolados URPE-6 e URPE-19 de *M. anisopliae*.

Tratamentos		URPE-6		URPE-19	
		IB ¹	Classificação ²	IB ¹	Classificação ²
Clorfenapir	0,25x ³	70	C	88,00	C
	0,5x	68,96	C	70,48	C
	1x	68,86	C	50,16	T
Espinosade	0,25x	97,60	C	83,90	C
	0,5x	89,16	C	84,31	C
	1x	77,97	C	69,10	C
Indoxacarbe	0,25x	98,44	C	82,72	C
	0,5x	70,36	C	76,69	C
	1x	68,82	C	72,19	C
Abamectina	0,25x	66,76	C	72,72	C
	0,5x	64,32	T	74,82	C
	1x	56,76	T	67,54	C
Nim	0,25x	70,11	C	72,82	C
	0,5x	64,14	T	66,29	C
	1x	63,81	T	62,95	T

¹ IB = Índice Biológico. Valor IB, segundo Alves *et al.* (2007)

²C = compatível; T = tóxico

³x = Concentrações utilizadas

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DOS OVOS DE *Tuta absoluta* (MEYRICK)
(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) E DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE FÊMEAS APÓS
PARASITISMO POR *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK¹.

LAURICI M. PIRES¹, EDMILSON J. MARQUES¹, VALÉRIA WANDERLEY TEIXEIRA¹, ÁLVARO A.C.
TEIXEIRA², LUIS C. ALVES³ E SÉRGIO B. ALVES⁴

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros
s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, Av. Moraes Rego s/n, 50670-
420, Recife, PE.

⁴Depto. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, C. postal 9, 13418-
900, Piracicaba, SP.

¹PIRES, L., E.J. MARQUES, V. WANDERLEY-TEIXEIRA, A.A.C. TEIXEIRA, L.C. ALVES & S.B. ALVES. Avaliação ultra-estrutural dos ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e do potencial reprodutivo de fêmeas após parasitismo por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROK. Micron.

RESUMO – Entre os microrganismos empregados no controle biológico destaca-se o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., produzido e formulado mundialmente para o controle de insetos praga de diversas culturas agrícolas. Avaliou-se ultra-estruturalmente o mecanismo de infecção do isolado URPE-6 de *M. anisopliae* sobre ovos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae) e seu efeito sobre a fecundidade e mortalidade de fêmeas. Os ovos foram pulverizados com suspensão na concentração 10^6 conídios mL⁻¹. A análise em microscopia eletrônica de varredura mostrou que os processos de germinação e penetração dos conídios nos ovos de *T. absoluta* iniciaram dentro do período de 6 horas após a inoculação. Diversos corpos hifais foram observados a partir de 12h e uma intensa extrusão do micélio cobrindo toda a superfície externa dos ovos 72h após a inoculação. A infecção de fêmeas pelo fungo não afetou a oviposição e fecundidade, porém afetou a sobrevivência com mortalidade total e confirmada de 54,2 e 37,14%, respectivamente. Apesar de sua atividade moderada em adultos, o isolado URPE-6 de *M. anisopliae* se mostrou promissor no controle de *T. absoluta* em virtude de sua patogenicidade e virulência a ovos desta praga.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos Entomopatogênicos, traça-do-tomateiro, controle biológico, microscopia eletrônica

ULTRASTRUCTURE OF *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)
PARASITIZED EGGS AND THE REPRODUCTIVE POTENCIAL OF FEMALES AFTER
PARASITISM BY *Metarhizium anisopliae*(METSCH.) SOROK

ABSTRACT – Among the microorganisms employed over the biological control, it is highlighted the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., produced and formulated world wide for the control of pests from several agricultural cultures. It was evaluated ultrastructurally the mechanism of infection of the isolate URPE-6 of *M. anisopliae* over eggs of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) and its effects on the fecundity and mortality of females. The eggs were pulverized with suspension in a concentration of 10^6 conidium mL^{-1} . The analysis under scanning electron microscopy showed that conidia germination and penetration processes in the eggs of *T. absoluta* occurred the period of 6 hours after inoculation. Several hyphal bodies were observed from 12h and an intense extrusion of the mycelium covering all the external surface of the eggs 72h after the inoculation. The infection of the females by the fungus did not affect the oviposition and fecundity, however it affected the survival with total and confirmed mortality of 54,2% and 37,14%, respectively. Despite its moderate activity in adults, the isolate URPE-6 of *M. anisopliae* showed promising in the control of *T. absoluta* due to its pathogenicity and virulence to eggs from this pest.

KEY WORDS: Entomopathogenic fungi, tomato leafminer, pathogenicity, biological control, electronic microscopy

Introdução

Entre os organismos empregados no controle biológico de insetos, destaca-se o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., sendo assinalado como um dos mais importantes agentes de biocontrole de diversas pragas agrícolas. No Brasil, a utilização deste patógeno representa 70% de toda a área tratada com fungos, sendo empregado em programas de sucesso como o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar e pastagens, além de lagartas desfolhadoras, moscas brancas, e outras pragas de importância agrícola (Leucona 2002).

O ciclo de desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos envolve os processos de disseminação, adesão, germinação e penetração do patógeno resultando em invasão e colonização do hospedeiro, com posterior conidiogênese sobre a cutícula do inseto. Geralmente penetram no inseto através da cutícula, por pressão mecânica e ação enzimática. O tempo para que ocorra cada uma dessas etapas varia de acordo com a espécie do fungo e condições ambientais. Entretanto, o tempo entre a infecção e morte do inseto pode variar de acordo com a virulência do isolado e quantidade do inóculo (Alves 1998).

Esses agentes entomopatogênicos possuem a vantagem de afetar todos os estágios de desenvolvimento dos insetos, incluindo o estágio de ovo (Samuels *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2005, Rampelotti *et al.* 2007). Tem sido demonstrado ainda que diferentes isolados de *M. anisopliae* podem causar efeitos no potencial reprodutivo de fêmeas infectadas alterando a fecundidade. Estudos realizados por Castillo *et al.* (2000) demonstraram que diferentes isolados podem causar variação na fecundidade em fêmeas de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera:Tephritidae). Estes autores observaram ainda que *M. anisopliae* reduziu a fecundidade em 47%, enquanto que *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill ocasionou uma redução de apenas 4% no número de ovos/fêmea, não diferindo da testemunha.

Pesquisas desenvolvidas com o auxílio de microscopia eletrônica têm ajudado a compreender o processo de penetração e infecção de fungos entomopatogênicos sobre alguns insetos de importância agrícola (Moino Jr. *et al.* 2002, Neves & Alves 2004). Estes estudos têm demonstrado as diferentes velocidades de infecção dos patógenos, produção de enzimas e mecanismos de penetração dos fungos no hospedeiro, que auxiliam na compreensão dos processos de especificidade, patogenicidade e virulência. St.Leger *et al.* (1996) confirmaram intensa produção de enzimas na parede celular de *M. anisopliae* durante o processo de penetração da cutícula de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae). Além disto, investigações com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura, ajudaram a comprovar a inibição do comportamento de limpeza de *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) quando tratado com fungos entomopatogênicos associados a sub-doses do inseticida imidacloprid (Neves & Alves 2000).

O fungo *M. anisopliae* tem sido relatado como patogênico a ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), praga de grande importância para a cultura do tomateiro. Rodriguez *et al.* (2006) observaram uma variabilidade nos níveis de susceptibilidade dos ovos de *T. absoluta* quando tratados com diferentes isolados de *M. anisopliae*, sendo o mais patogênico Qu-M558 provocando mortalidade de 80%. No entanto, não há registros na literatura sobre os eventos que envolvem o mecanismo de penetração de fungos sobre ovos desta praga, porém, estudos desta natureza, além de fornecer informações básicas sobre os processos de infecção de fungos entomopatogênicos, ajudam a identificar diferentes estratégias de infecção e velocidades de desenvolvimento que podem, parcialmente, explicar uma maior ou menor virulência encontrada nos isolados (Neves & Alves 2004). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar ultraestruturalmente o mecanismo de infecção de *M. anisopliae* isolado URPE-6 sobre ovos de *T. absoluta* e estudar o efeito deste isolado na fecundidade e mortalidade de fêmeas.

Material e Métodos

Obtenção dos ovos. As posturas foram obtidas a partir da criação de *T. absoluta* mantida no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para tanto, folhas de tomateiro var. Santa Clara, foram colocadas em gaiola telada, com 58cm de altura x 37cm de comprimento x 49,5cm de largura, contendo os insetos adultos para oviposição, alimentados com solução açucarada a 10%. A criação foi mantida em condições de laboratório a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Obtenção do isolado. Utilizou-se o fungo *M. anisopliae* URPE-6, isolado de *Mahanarva posticata* (Stal), mantido na micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos/UFRPE. Este isolado foi previamente selecionado por sua elevada patogenicidade para ovos de *T. absoluta*.

Processo de infecção de *M. anisopliae* sobre ovos de *T. absoluta*. Ovos da traça do tomateiro, com idade até 24 horas, foram pulverizados com a suspensão do patógeno na concentração 10^6 conídios mL^{-1} , sendo a testemunha pulverizada apenas com água destilada e esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80 a 0,01%. Após a inoculação, foram divididos em 10 grupos compostos por 40 ovos cada, acondicionados em caixas de acrílico forradas com papel filtro e mantidos em B.O.D. a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h. Os ovos inoculados e suas respectivas testemunhas foram coletados nos intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Após a coleta em cada tempo preestabelecido, os ovos foram divididos em duas parcelas: uma destinada à microscopia eletrônica de varredura (MEV) e outra de transmissão (MET), analisadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os ovos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) e posteriormente lavados três vezes em tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 por 30

min, na ausência de luz a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se à lavagem e à desidratação em séries crescentes de etanol por 10 min cada. Os ovos foram submetidos à secagem pelo método do Ponto Crítico usando CO₂ líquido, metalizados com ouro coloidal durante 1 min e levados para análise em microscópio JEOL-5600LV.

Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Após fixação em solução de glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) por 4h, os ovos foram pós-fixados por 1h em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2, e em seguida, lavados três vezes por 10 min em tampão. Posteriormente, foram desidratados em séries crescentes de acetona, por 10 min cada etapa, à temperatura ambiente. A infiltração foi realizada em resina Epon e acetona em estufa a 70°C por 48h para polimerização. Os blocos foram colocados no dessecador por 24h. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Reichert Ultracut, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados em microscópio Zeiss EM 109.

Efeito de *M. anisopliae* na oviposição, fecundidade e sobrevivência de fêmeas. Para observação da oviposição, fêmeas de *T. absoluta* recém emergidas e acasaladas foram confinadas em gaiolas medindo 15 x 16cm (diâmetro x altura), alimentadas com solução açucarada a 10%. Como substrato para postura foram colocados dois folíolos de tomate, com o pecíolo fixado em esponja embebida com solução nutritiva de água destilada e Biofert Plus a 0,1% (Biokits Indústria e Comércio LTDA). Um dos folíolos foi pulverizado com suspensão de *M. anisopliae* na concentração de 10⁷ conídios mL⁻¹ e o outro tratado apenas com água destilada e esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80 0,01%(ADE + E) (testemunha). Após 48 horas, foram contados os ovos em cada tratamento. Foram formadas 35 repetições, sendo cada uma delas composta por uma gaiola contendo uma fêmea. Para observação da fecundidade e mortalidade de fêmeas, a metodologia empregada foi semelhante à descrita acima, contudo em cada gaiola colocou-se

apenas um folíolo. Foram formadas 35 gaiolas contendo um folíolo tratado com a suspensão do patógeno e outras de mesma quantidade com o folíolo pulverizado apenas com ADE + E. As observações foram diárias por um período de 16 dias, anotando-se a postura diária de cada fêmea, assim como a sua mortalidade. O experimento foi realizado em condições de laboratório a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Análises estatísticas. Os dados de oviposição entre os tratamentos com *M. anisopliae* e o grupo controle foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de fecundidade ao longo do período de observação (16 dias) foram submetidos a ANOVA, considerando medidas repetidas no tempo, empregando-se o Proc ANOVA do SAS adaptado de Cody & Smith (1997) e análise de regressão tendo como variáveis dependentes para cada tratamento, o número de ovos em função do tempo. Em relação à sobrevivência de fêmeas no período de 16 dias, fez-se a comparação entre os tratamentos pelos testes Log-Rank e Wilcoxon através do método Kaplan Meyer. Todas as análises foram conduzidas no programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e Discussão

As análises em MEV mostraram que os processos de germinação e penetração dos conídios de *M. anisopliae* em ovos de *T. absoluta* iniciaram dentro do período de 6 horas após a inoculação (Fig.1A). Embora não tenha sido observado registro deste processo para *T. absoluta*, na literatura consultada, Garcia *et al.* (2005) estudando o mecanismo de infecção de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) por *M. anisopliae* isolado E9, observaram que 67% dos ovos apresentaram germinação de conídios em sua superfície 18h após a infecção e que 80% dos ovos infectados foram colonizados pelo fungo quatro dias após. A rápida germinação e penetração no corpo do hospedeiro são características importantes para a virulência das linhagens (Garcia *et al.*

2004). Observações através de MET mostraram uma íntima associação do conídio germinado de *M. anisopliae* com o córion do ovo (Fig. 2A), sugerindo a formação de estruturas e/ou substâncias que possivelmente estão envolvidas nos processos de adesão, germinação e penetração. Segundo Schrank *et al.* (2007) estes processos representam um grau de complexidade que envolve fatores químicos, interações hidrofóbicas entre as superfícies do conídio e do hospedeiro e atividade enzimática como a formação de proteases e quitinases.

A penetração de *M. anisopliae* ocorreu em diferentes regiões do ovo do inseto, não havendo maior ocorrência deste processo na região da micrópila (Fig. 1F) abertura do córion na região anterior do ovo (Garcia & Fernandez 2001). Com relação ao processo de infecção em insetos por fungos entomopatogênicos, pesquisas relatam haver uma grande variação na densidade e germinação de conídios em diferentes partes do corpo, sendo encontrados principalmente próximos a aberturas naturais (Kirkland 2004), fato que pode diferir dependendo do hospedeiro e patógeno estudados (Garcia *et al.* 2004).

Observou-se mais de um ponto de penetração para um mesmo tubo germinativo (Fig. 1D). Processo semelhante foi citado por Neves & Alves (2004) ao estudar o mecanismo de infecção de *C. cumulans* pelos fungos *B. bassiana* (447) e *M. anisopliae* (1037). De acordo com os autores, este processo pode estar associado com uma alta virulência do isolado. A formação de apressórios (Figs. 1B e 1D) também foi verificado em algumas regiões. Estas estruturas são caracterizadas pela dilatação da hifa na extremidade do tubo germinativo, com conseqüente acúmulo interno de açúcares para geração de pressão osmótica que auxilia na penetração (Schrank *et al.* 2007).

Houve crescimento de hifas com tubos germinativos curtos e longos (Figs. 1C e 1E) sobre a superfície dos ovos. Resultados semelhantes foram relatados por Moino Jr. *et al.* (2002) estudando o desenvolvimento externo de fungos entomopatogênicos sobre *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae). Estes autores concluíram que hifas com tubos germinativos

mais longos ocorreriam apenas em regiões onde a cutícula fosse mais dura, como a cabeça do inseto, que oferece uma maior resistência ao patógeno. No entanto, Schabel (1978) pesquisando alterações morfológicas durante a penetração de *M. anisopliae* em *Hylobius pales* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) observaram hifas com tubos germinativos longos e curtos em um mesmo local da cutícula, fato semelhante ao ocorrido nessa pesquisa sobre o córion do ovo de *T. absoluta*, sugerindo que outros fatores além da estrutura de superfície de contato com o hospedeiro podem influenciar no desenvolvimento do tubo germinativo.

O processo de colonização foi observado através de análises em MET com a presença, no interior do ovo, de diversos corpos hifais de tamanho pequeno nos períodos de 12 e 24 h (Figs. 2B e 2C), quando comparados aos observados 72 h após a inoculação do patógeno, produzindo uma desorganização na blastoderme (Figs. 2D, 2E e 2F). Estudando o processo de infecção do tripses *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) por *M. anisopliae*, Vestergaard *et al.* (1999), observaram o processo de colonização, descrevendo os corpos hifais como estruturas que aparentam diferentes formas e tamanhos, se multiplicam por fissão binária e que aumentam de tamanho, ficando mais alongados, ao longo do tempo do processo de colonização. Também foi observado que essas células contêm citoplasma, com vacúolos de tamanhos variados contendo material eletrôn-denso. Tais descrições estão de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho (Figs. 2E e 2F).

No período de 72h após a infecção ocorreu a extrusão do micélio cobrindo toda a superfície externa dos ovos de *T. absoluta* (Figs. 3C e 3D), sendo também observado um acentuado enrugamento do córion (Fig. 3B) indicando uma possível desidratação do ovo pela ação do patógeno. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodriguez *et al.* (2006) que observaram desidratação visível nos ovos de *T. absoluta*, quatro dias após infecção por *M. anisopliae*, devido a uma possível degradação enzimática do córion pela ação do patógeno.

Pesquisas a respeito do processo de infecção de entomopatógenos são importantes na identificação de isolados mais patogênicos e virulentos. Moino Jr. *et al.* (2002) observaram que o isolado E9 de *M. anisopliae* apresentou um tempo mais curto para a penetração e colonização de *H. tenuis*, provocando mortalidade mais rápida nesses insetos que os causados pelos demais isolados estudados. Estes resultados demonstram a importância da compreensão destas fases do processo de infecção na seleção de isolados para o controle biológico de insetos. Avanços nesta, área implicam num aprofundamento deste tipo de pesquisa, através da descrição ao nível molecular do processo de infecção por entomopatógenos, que é complexo e multifatorial, sendo a adesão e penetração eventos importantes na definição da especificidade de um determinado isolado por um hospedeiro (Schrank *et al.* 2007).

Com relação ao potencial reprodutivo, algumas características bióticas do hospedeiro podem interferir na virulência de um determinado patógeno. Assim, suas estratégias reprodutivas, predisposição à doença e as diferentes fases de desenvolvimento são fatores que podem afetar a suscetibilidade de patógenos (Alves & Leucona 1998). Os resultados concernentes ao estudo realizado com as fêmeas adultas mostraram que não houve efeito do isolado URPE-6 de *M. anisopliae* na oviposição e fecundidade de *T. absoluta*.

Não há registros sobre o efeito de *M. anisopliae* na oviposição de *T. absoluta*, porém ao estudar a oviposição dessa praga em folhas de tomate tratadas por *Bacillus thuringiensis* Berl. var. *kurstaki*, Marques & Alves (1996) observaram que o número de ovos nas folhas não tratadas superou significativamente a média de ovos nas folhas tratadas, sugerindo que esse patógeno poderia agir como repelente para oviposição de *T. absoluta*. Esse resultado não ocorreu em relação à *M. anisopliae* e *T. absoluta* nessa pesquisa, pois não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados ($F_{1,68} = 1,85$; $P = 0,17$).

Com relação à fecundidade, não foram observadas diferenças estatísticas no número de ovos/fêmea ($F_{1,68} = 2,15$; $P = 0,14$), bem como no número de ovos/fêmea ao longo do tempo ($F_{15,68} = 0,70$; $P = 0,79$), entre os tratamentos. Porém, observou-se que houve uma queda significativa no número de ovos postos ao longo do tempo (Fig. 4) tanto para a testemunha ($\hat{y} = 36,87 - 6,65x + 0,28x^2$, $R^2 = 0,64$; $F = 513,15$; $P < 0,0001$), quanto para as fêmeas tratadas com *M. anisopliae* ($\hat{y} = 40,31 - 7,62x + 0,33x^2$, $R^2 = 0,58$; $F = 399,69$; $P < 0,0001$). Inicialmente o número de ovos postos pelas fêmeas infectadas foi maior do que as não infectadas, com uma tendência a diminuir após o 3º dia de oviposição. Resultados semelhantes foram observados por Arthurs & Thomas (2000) estudando o efeito de *M. anisopliae* var. *acridum* sobre a fecundidade de *Locustana pardalina* (Walker) (Orthoptera: Acrididae). Estes autores observaram que as fêmeas tratadas apresentaram um número inicial de ovos maior que o grupo controle, não sendo registrada nenhuma diferença estatística na fecundidade até o final do período estudado. Fêmeas de *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae) tratadas com *M. anisopliae* var. *acridum* também apresentaram um número maior de posturas quando comparadas com o controle nos primeiros dias após a infecção, não havendo diferença no número final de ovos entre os tratamentos estudados (Blandford & Thomas 2001).

O efeito na fecundidade de fêmeas infectadas por fungos entomopatogênicos pode variar dependendo do patógeno, hospedeiro e forma de contaminação. Fêmeas de *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) apresentaram redução na produção de ootecas apenas quando foram tratadas topicamente com *M. anisopliae*. As fêmeas sadias acasaladas com machos tratados não apresentaram redução na produção de ootecas (Quesada-Moraga *et al.* 2004). Por outro lado, fêmeas da broca da raiz da batata doce *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) contaminadas por *M. anisopliae* através da agregação e cópula com machos infectados, não

tiveram a fecundidade diária afetada, porém a mortalidade das fêmeas após a contaminação afetou negativamente o número total de ovos (Rana & Villacarlos 1991).

A sobrevivência de fêmeas de *T. absoluta* tratadas com *M. anisopliae* foi afetada diferindo da testemunha pelo teste Log-Rank ($\chi^2_{Gl=1} = 31,08$; $P = 0,0001$) e teste de Wilcoxon ($\chi^2_{Gl=1} = 28,94$; $P = 0,0001$). Ocorreu mortalidade a partir do 5º-dia (Fig. 5), com mortalidade total e confirmada de 54,2 e 37,14%, respectivamente, ao final do período estudado. Os resultados obtidos indicam que o isolado URPE-6 de *M. anisopliae* apresentou maior patogenicidade para ovos do que para adultos. Alguns trabalhos relatam diferenças entre os estágios de desenvolvimento dos insetos na suscetibilidade a fungos entomopatogênicos. Estudos sobre o efeito de *M. anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) mostraram que a fase de ovo foi mais suscetível do que as ninfas e adultos (Rampelotti *et al.* 2007). Com relação ao ácaro *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) foi observado que os ovos e adultos foram mais suscetíveis a *M. anisopliae* do que as larvas, protoninfas e deutoninfas (Wekesa *et al.* 2006).

Embora *M. anisopliae* tenha sido pouco patogênico aos adultos e não tenha afetado a fecundidade de fêmeas, os resultados mostram que o isolado URPE-6 apresentou elevada patogenicidade e virulência a ovos de *T. absoluta*, indicando que *M. anisopliae* pode ser um importante elemento no controle dessa praga.

Agradecimentos

À CAPES pelo apoio financeiro. A Jorge B. Torres (UFRPE) pelo suporte nas análises estatísticas. À Sérgio Santos (CPqAM-FIOCRUZ) pela colaboração no preparo e observação do material em microscopia eletrônica.

Literatura Citada

- Alves, S. B. 1998.** Fungos Entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B. & R.E. Leucona. 1998.** Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p.97-163. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Arthurs, S. & M.B. Thomas. 2000.** Effects of a mycoinsecticide on feeding and fecundity of the Brown locust *Locustana pardalina*. Crop Sci. 10: 321-329.
- Blanford, S. & M.B. Thomas. 2001.** Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridium*. J. Invertebr. Pathol. 78: 1-8.
- Castillo, M.A., P. Moya, E. Hernáñez & E. P.Y. Fera. 2000.** Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their Extracts. Biol. Control 19: 274-282.
- Cody, R.P. & J.K. Smith. 1997.** Applied statistics and the sas programming language. 4^a ed. Upper Saddle River, Prentice Hall, 445p.
- Ferreira, J.F., E.J. Marques, I.M. R. Marques, J.V. Oliveira & H.J.G. Santos Júnior. 2005.** Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos de *Alabama argillacea* (Hübner.) (Lepidoptera: Noctuidae). Magistra 17: 19-123.
- Garcia, M.V., A.C. Monteiro & M.P. Szabó. 2004.** Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. Rev. Centr. Cienc. Rural. 34: 1513-1518
- Garcia, M.V., A.C. Monteiro, M.J.P. Szabo, N. Prette & G.H. Bechara. 2005.** Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. Braz. J. Microbiol. 36: 368-372.

- Garcia, S.M.L. & C.G. Fernandez. 2001.** Ovogênese, p.62-85. In S.M.L. Garcia & C.G. Fernandez (eds.), Embriologia. Porto Alegre, Artmed, 416p.
- Kirkland, B.H., E. Cho & N.O. Keyhani. 2004.** Diferencial susceptibilidad of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Biol. Control. 31: 414-421.
- Lecuona, R.E. 2002.** Situación actual y perspectivas de uso de bioplaguicidas en Latinoamérica. p.9-16. In R.E. Lecuona, Curso internacional de producción y uso de agentes microbianos para el control de plagas en agricultura ecológica. Turrialba, CATIE y GTZ, 22p.
- Marques, I.M.R. & S.B. Alves. 1996.** Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berl. Var. *kurstaki* sobre *Scobipalpuloides absoluta* Meyer. (Lepidoptera: Gelechiidae). An. Soc. Entomol. Bras. 25: 39-45.
- Moino Jr, A., S.B. Alves, R.B. Lopes, P.M.O.J. Neves, R.M. Pereira & S.A. Vieira. 2002.** External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. Sci. Agric.59: 267-273.
- Neves, P.M.O.J. & S.B. Alves. 2000.** Grooming capacity inhibition in *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) inoculated with entomopathogenic fungi and treated with imidacloprid. An. Soc. Entomol. Bras. 29: 537-545.
- Neves, P.M.O.J. & S.B. Alves. 2004.** External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Neotrop. Entomol. 33: 51-56.
- Quesada-Moraga, E., R. Santos-Quirós, P. Valverde-García & C. Santiago-Alvarez. 2004.** Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 87: 51-58.

- Rampelotti, F.T., A. Ferreira, H.F. Prando, A.D. Grützmacher, J.F. da S. Martins, F.A. Tcacenco & M.L.T. Mattos. 2007.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. Arq. Inst. Biol. 74: 141-148.
- Rana, R.L. & L.T. Villacarlos. 1991.** Effect of *Metarhizium anisopliae* (Match.) Sorokin on the fecundity and survival of the sweet potato, *Cylas formicarius* (Fabr.) (Coleoptera:Curculionidae). Philip. Entomol. 8: 963-972.
- Rodríguez, M.S., M.P. Gerding & A. France. 2006.** Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidóptera: Gelechiidae). Agric. Téc. 66: 151-158.
- Samuels, R.I., D.L.A. Coracini, C.A.M. Santos & C.A.T. Gava. 2002.** Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera:Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Biol. Control 23: 269-273.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS /STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schabel, H.G. 1978.** Percutaneous infection of *Holobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 31: 180-187 .
- Schrank, A., C.C. Staats, L. Broetto, J.T. Boldo, L.R.M. de Carvalho, A. Junges, J.S. Beringer, L.K. Rosa e Silva & M.H. Vainstein. 2007.** *Metarhizium*: genes envolvidos no processo de penetração em artrópodes, p.96-101. In L.C. Maia, E. Malosso, A.M. Yano-Melo (eds.) Micologia avanços no conhecimento. Recife, Ed. Universitária, 430p.
- St. Leger, R.J., Lokesh Joshi, Michael J. Bidochka, Nancy W. Rizzo, And Donald W. Roberts. 1996.** Biochemical characterization and ultrastructural localization of two

extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol. 4: 1257-1264.

Vestergaard, S., T.M. Butt, J. Bresciani, A.T. Gillespie & J. Eilenberg. 1999. Light and electron microscopy studies of the infection of the Western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 73: 25-33.

Wekesa, V.W., M. Knapp, N.K. Maniania & H.I. Boga. 2006. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. J. Appl. Entomol. 130: 155–159.

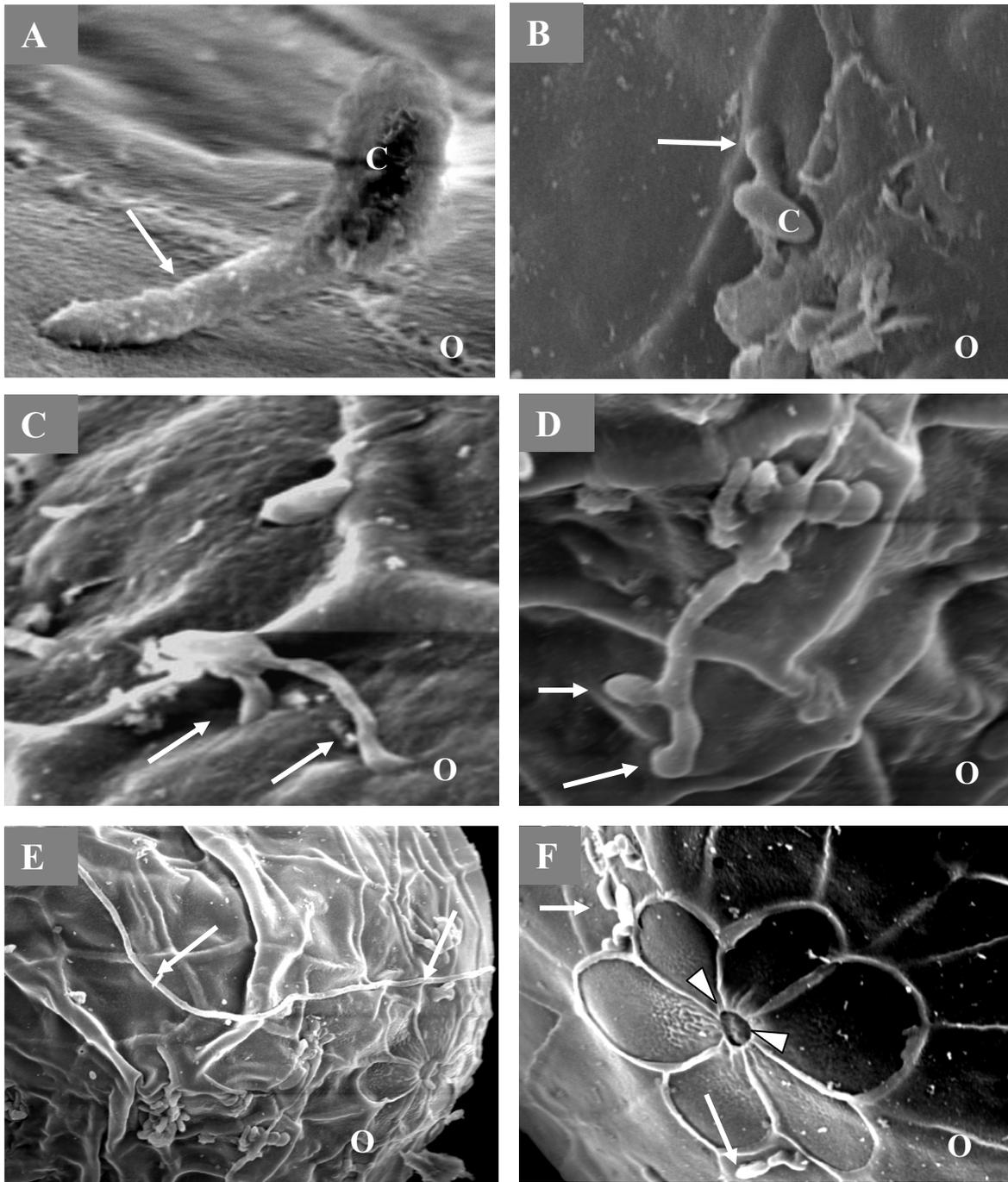


Figura 1. Eletromicrografias de varredura mostrando o processo de penetração de *M. anisopliae* em ovos (O) de *T. absoluta*. (A) Germinação do conídio (C) com penetração do tubo germinativo (seta) - 6h (7.500X); (B) Germinação do conídio (C) com formação de apressório (seta) - 6h (2.300X); (C) Formação de mais de um ponto de penetração (setas) de um mesmo conídio- 12h (2.700X); (D) Formação de apressórios (setas) - 48h (2.200X); (E) Tubo germinativo longo (setas) - (850X); (F) Micrópila do ovo (cabeça de seta) mostrando ausência de penetração do fungo. Note presença de conídios germinados (setas) próximo à micrópila (1.400X).

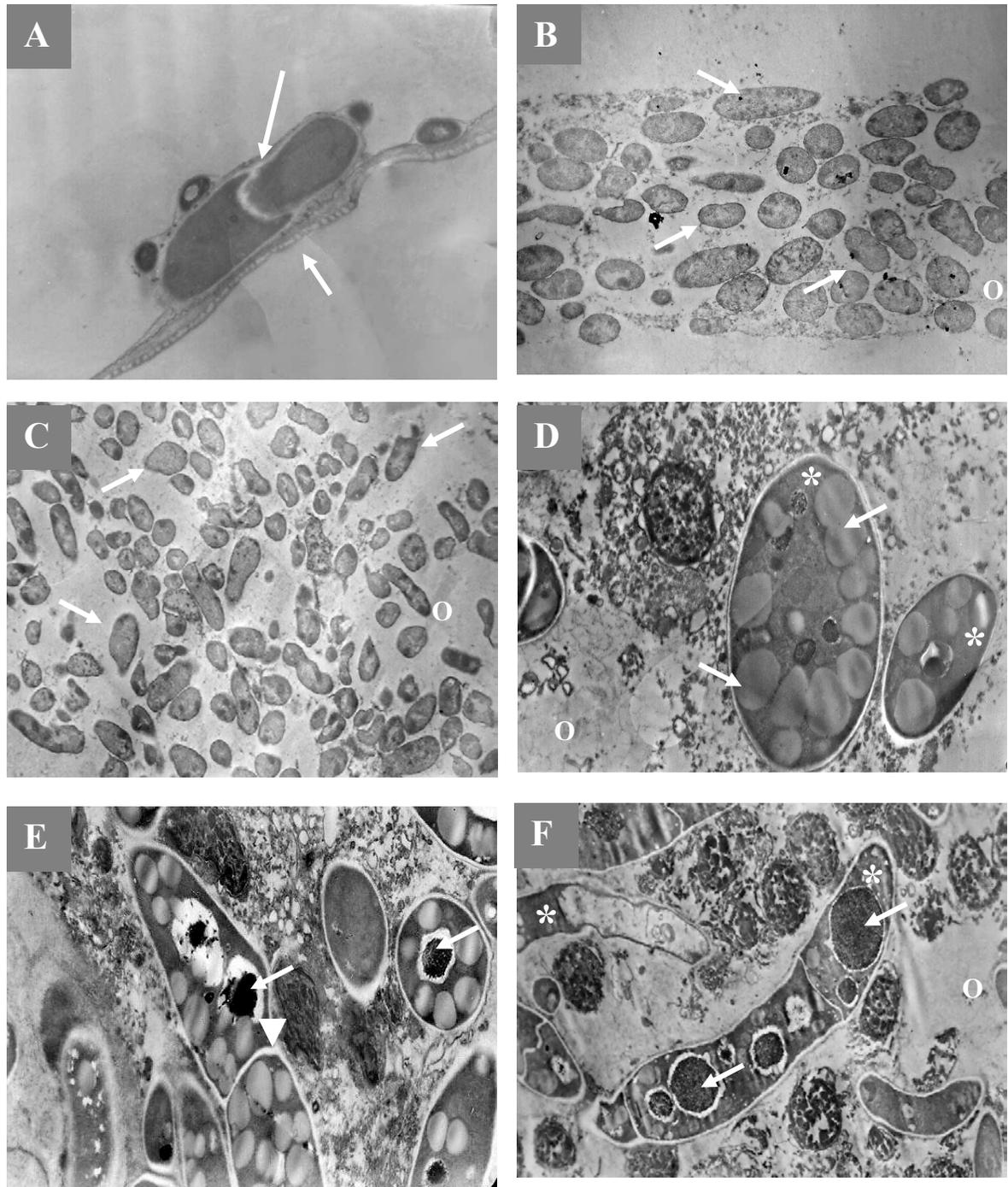


Figura 2. Eletromicrografias de transmissão mostrando os processos de germinação e colonização de *M. anisopliae* em ovos (O) de *T. abs urta*. (A) Íntima associação do conídio (seta longa) com o córion (seta curta)– 6h (10.000X) MET; (B) Corpos hifais (setas) de *M. anisopliae* no interior do ovo 12h (10.000X) e (C) 24h (6.700X); (D-F) Corpos hifais (*) de diferentes formas e tamanhos – 72h, com inclusões elétron luscentes (setas) (8.000X); (E) Hifas com septos (cabeça de seta) e presença de corpos de inclusões elétron densos (setas) (5.000X).

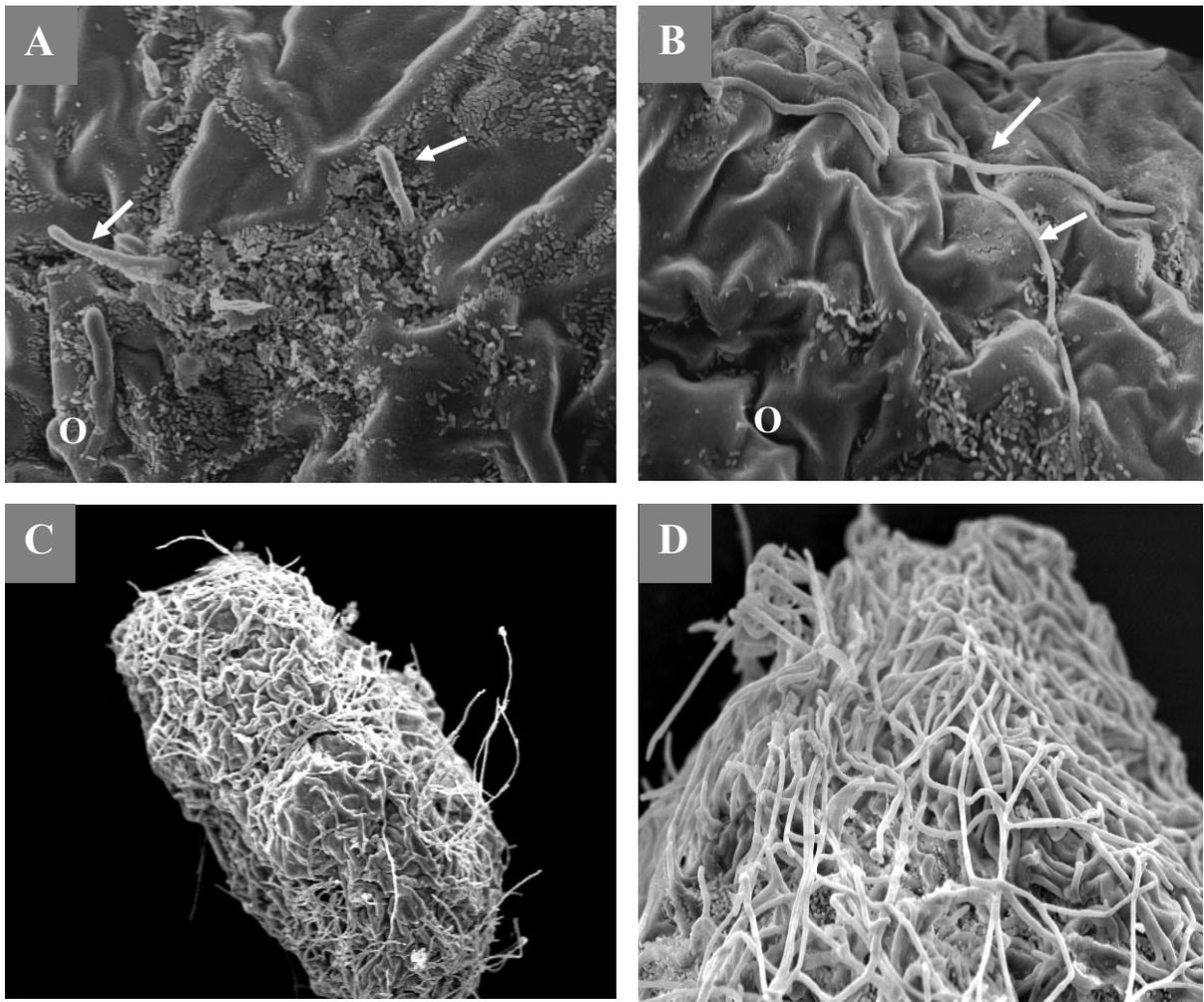


Figura 3. Eletromicrografias de varredura mostrando o processo de extrusão de *M. anisopliae* sobre ovos (O) de *T. absoluta*. 72h (A) Detalhe de ovo de *T. absoluta* com extrusão inicial do fungo (setas) (1.400X); (B) Aparente desidratação do ovo (O), notar presença de hifas (setas) (2.200X); (C) Ovo de *T. absoluta* totalmente envolvido com micélio do fungo (330X); (D) Detalhe da formação do micélio (1.100X).

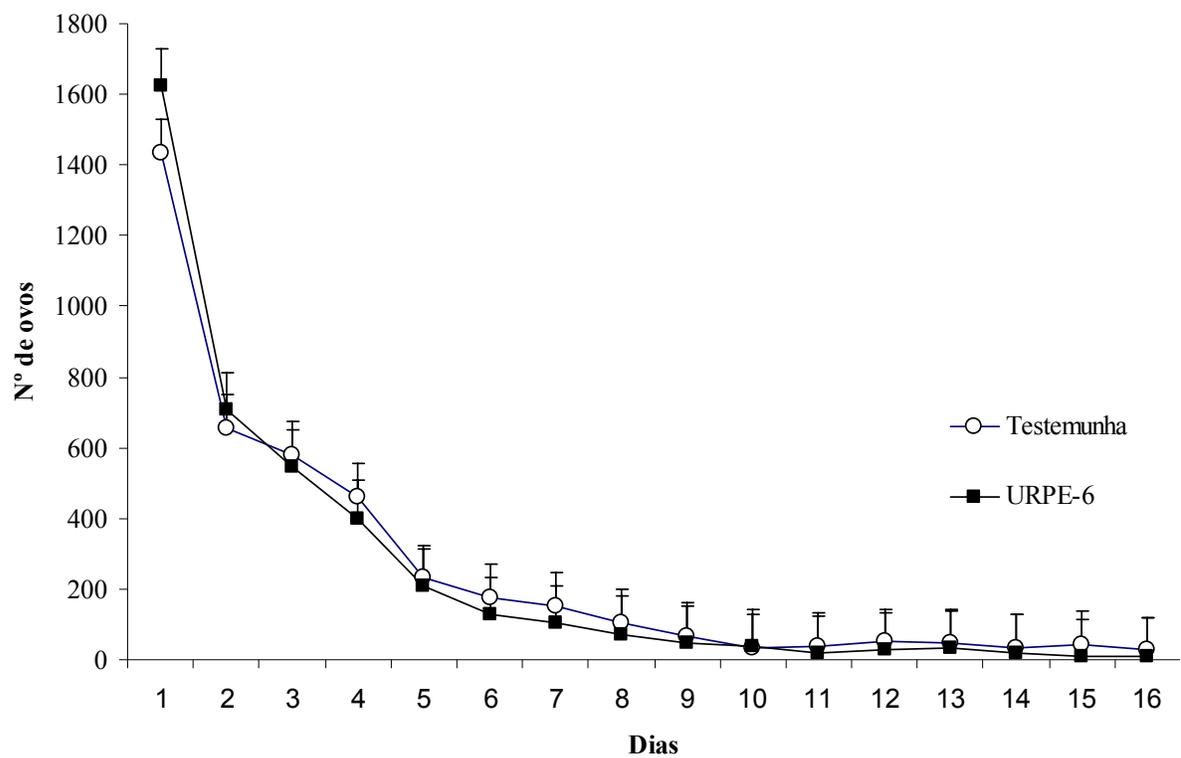


Figura 4. Oviposição diária (+EP) por fêmeas (n = 35) de *T. absoluta* tratadas com *M. anisopliae* em laboratório. Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R: $70 \pm 10\%$, fotofase: 12h.

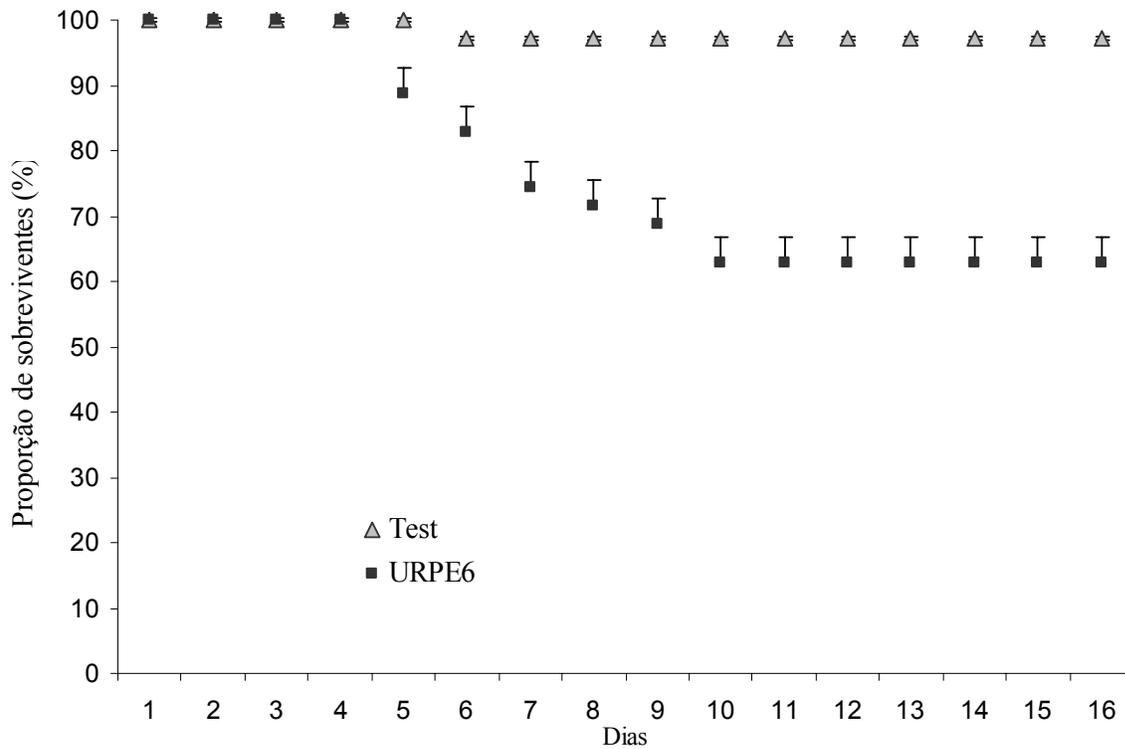


Figura 5. Proporção de fêmeas sobreviventes (+EP) de *T. absoluta* infectadas com *M. anisopliae* isolado URPE-6 em condições de laboratório Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R: $70 \pm 10\%$, fotofase: 12h.