



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MICHELE POTRICH

**SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A  
*Trichogramma pretiosum* RILEY (HYMENOPTERA:  
TRICHOGRAMMATIDAE) E VIRULÊNCIA A *Bemisia tabaci*  
(HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)**

MICHELE POTRICH

**SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A  
*Trichogramma pretiosum* RILEY (HYMENOPTERA:  
TRICHOGRAMMATIDAE) E VIRULÊNCIA A *Bemisia tabaci*  
(HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira  
Janeiro Neves

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Francisco Angeli  
Alves

Londrina  
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos***

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P864s Potrich, Michele

Seletividade de fungos entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e Virulência a *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)./ Michele Potrich. – Londrina, [s.n], 2010.

134 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves, Dr.

Co-orientador: Prof. Luis Francisco Angeli Alves, Dr.

Tese (Doutorado) – UEL. Londrina, 2010.

1.Parasitóide. 2. Organismo não-alvo. 3.Mosca-branca.  
4.Controle Biológico. 5. Seletividade. I. Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro, orient. II.Universidade Estadual de Londrina.  
III.Título.

CDD: 632.7

CDU: 595.7

MICHELE POTRICH

**SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A**  
***Trichogramma pretiosum* RILEY (HYMENOPTERA:**  
**TRICHOGRAMMATIDAE) E VIRULÊNCIA A *Bemisia tabaci***  
**(HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Amarildo Pasini  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Flávio Moscardi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves  
UNIOESTE

---

Profa. Dra. Vanda Pietrowski  
UNIOESTE

---

Dr. Adeney de Freitas Bueno  
EMBRAPA – Londrina – PR

---

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez  
EMBRAPA – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 14 de junho de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu pequenino grande homem, Filipe, por todos os minutos que me ausentei em corpo ou pensamento.

*TE AMO FILHO!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela esperança e pela força que me dá todos os dias!

Ao Prof. Dr. Pedro M.O.J. Neves, pela serenidade e paciência, por ser um porto-seguro, pelas palavras de apoio e consolo (Calma, vai dar tudo certo! Não se preocupe!) e pelo carinho. Pela Orientação!

Ao Prof. Dr. Luis F. A. Alves, pelas orientações precisas, por fazer parte da minha formação acadêmica e pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanda Pietrowski, pelos ensinamentos, pelas orientações, pela disposição em sempre me atender.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Célia Guadalupe e ao Osvaldo Capello pelas orientações na condução dos experimentos em MEV.

À Vera e à Celeste, técnicas de Laboratório da Unioeste, pelo auxílio nos trabalhos de Microscopia de Luz.

Aos meus pais, Zeferino e Ivanete, pelo apoio, por acreditarem em mim, por me incentivarem, por me ensinarem a RESPEITAR cada pessoa na sua individualidade e por me darem tudo o que precisei para chegar até aqui: Amor e Educação.

Ao meu amigo, companheiro e esposo Flávio, por todas as vezes que assumiu o papel de mãe, por todas as vezes que me ajudou profissionalmente, psicologicamente, fisicamente. Pela paciência, pela compreensão, pelo incentivo, por todos os tipos de ajuda que alguém pode dar, e por ser a pessoa que mais acreditou em mim, muito mais que eu mesma. Obrigada! Te Amo!

Ao meu filho, por me ensinar a sempre sorrir e a viver, por ter sido a melhor terapia que alguém pode ter, por ser tão carinhoso e companheirinho. Por ter tido paciência!

Ao meu grande amigo Everton, por ser um irmão durante os últimos 8 anos, pela força nas horas difíceis e nas fáceis também, pelo carinho, amizade, brincadeiras, risos, choros e festas! Obrigada AMIGO!.

Ao pessoal do Laboratório de Zoologia de Invertebrados/Biotecnologia Agrícola que auxiliaram na condução dos experimentos: Bonini, Ana, Leonardo, Nicole, Louise, Elis e, em especial, a Jéssica, por todo o tempo dedicado em me auxiliar, mesmo nos finais de semana, nos feriados, nas noites e madrugadas. OBRIGADA!

À minha grande amiga Paola, pelo trabalho incondicional e sem hora, mas principalmente pelo carinho, que me fez tão bem.

Às alunas Mariana e Daiane, pelo auxílio na condução de experimentos.

Aos amigos e colegas de trabalho: Maria Madalena, Luciana, Eleandro, Ricardo, Daniela, Alfredo, Simone, pelo auxílio, apoio e companheirismo.

À Universidade Estadual de Londrina pela estrutura na realização do Doutorado.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (*Campus* Cascavel e *Campus* Marechal Cândido Rondon) pela disponibilização dos Laboratórios e infraestrutura.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (*Campus* Dois Vizinhos), pelas liberações, quando necessárias, e pela disponibilização de infraestrutura para a última parte deste trabalho.

E as demais pessoas não mencionadas, mas que contribuíram para este processo.

“Só há duas coisas infinitas: O Universo e a  
Estupidez Humana. Mas não estou muito seguro  
da primeira”

***Albert Einstein***

POTRICH, Michele. **Seletividade de fungos entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e virulência a *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)**. 2010. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Os fungos entomopatogênicos e o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) podem ser utilizados conjuntamente na cultura do tomate. No entanto, ainda não são claros os efeitos destes fungos sobre *T. pretiosum*. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo analisar a seletividade de fungos entomopatogênicos a *T. pretiosum* e avaliar a virulência destes sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Para isto foram utilizados dois isolados de *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 e Unioeste 57), dois de *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 e Esalq 09) e dois de *Isaria* sp. (IBCB 367 e IBCB 394). 1) Seletividade a *T. pretiosum*: os isolados foram pulverizados na concentração de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL sobre cartelas (1,0 x 5,0 cm) contendo ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). A testemunha constou da pulverização de água destilada esterilizada contendo Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%). Realizaram-se dois testes: (a) com chance de escolha para parasitismo, confinando uma fêmea de *T. pretiosum* com duas cartelas, uma pulverizada com o isolado e a outra com a testemunha, e (b) sem chance de escolha, que consistiu em pulverizar cartelas previamente ou posteriormente ao parasitismo. Foram realizadas observações em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e em Microscopia de Luz (ML). Em (a) os isolados provocaram repelência ao parasitismo de *T. pretiosum*, e em (b) as pulverizações pré-parasitismo e pós-parasitismo interferiram na porcentagem de adultos emergidos, período ovo-adulto e longevidade. Em MEV foram observados conídios aderidos às fêmeas que realizaram o parasitismo. Em ML observaram-se tecidos de adultos colonizados pelos isolados. 2) Estratégias de aplicação: Pós-parasitismo (A) cartelas foram submetidas ao parasitismo por *T. pretiosum* e, posteriormente pulverizadas com os isolados nos tempos de 24, 72, 144 e 168 h. Pré-parasitismo (B): as cartelas foram pulverizadas com os isolados a 0, 24, 48, 72 e 96 h e, posteriormente submetidas ao parasitismo. Foram realizadas observações MEV e em ML. Em (A) os isolados interferiram no período ovo-adulto, na longevidade e na emergência, enquanto em (B) verificaram-se alterações no período ovo-adulto, no número de ovos parasitados, na porcentagem de adultos emergidos e na razão sexual. Nas fases imaturas não foram observados indícios de infecção por fungos entomopatogênicos (ML). 3) Virulência a *B. tabaci*: os isolados foram pulverizados ( $1,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) sobre ninfas de *B. tabaci* de 3<sup>o</sup> instar, posteriormente avaliou-se a mortalidade confirmada e estimou-se a concentração letal média (CL<sub>50</sub>). Verificou-se que os isolados Unioeste 47 e IBCB 367 provocaram os maiores índices de mortalidade (84,1 e 98,6%) e apresentaram as menores CL<sub>50</sub> ( $4,1 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL).

**Palavras-chave:** Parasitóide. Organismo não-alvo. Mosca-branca. Controle biológico. Seletividade.

POTRICH, Michele. **Selectivity of entomopathogenic fungi to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and virulence to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae).** 2010. 134 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

The entomopathogenic fungi and the parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) can be used, at the same time, in the tomato culture. However, it is still unclear the effects of entomopathogenic fungi on *T. pretiosum*. Thus, this study aimed to analyze the selectivity of entomopathogenic fungi against *T. pretiosum* and assess the virulence on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Two isolates of each of their entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 and Unioeste 57), *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 and Esalq 09) and *Isaria* sp. (IBCB 367 and IBCB 394) were used. 1) Selectivity to *T. pretiosum*: the isolates were sprayed at a concentration of  $1.0 \times 10^9$  conidia/mL on cards (1.0×5.0 cm) containing *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) eggs. The control consisted of sprayed sterile distilled water containing Tween<sup>®</sup> 80 (0.01%). Two tests were conducted: (a) free choice for parasitism by confining a female *T. pretiosum* with two cards, one sprayed with the isolate, the other with the control, and (b) no choice, which consisted of sprayed cards prior or subsequent to parasitism. Observations were made in Scanning Electron Microscope (SEM) and Light Microscopy (LM). At (a) the isolates caused repellency to parasitism by *T. pretiosum*, and at (b) the pre and post-parasitism spraying interfered in the percentage of emerged adults, egg-adult cycle and longevity. At SEM, it was observed conidia attached to females that realized parasitism. At ML, it was observed adult tissues colonized by the isolates. 2) Strategies for implementation: Post-parasitism (A) cards were submitted to parasitism by *T. pretiosum* and then sprayed with the isolates at 24, 72, 144 and 168 h. Pre-parasitism (B): the cards were sprayed with the isolates at 0, 24, 48, 72 and 96 h and then subjected to parasitism. Observations were made in Scanning Electron Microscope (SEM) and Light Microscopy (LM). In (A) the isolates affected the egg-adult cycle, the emergence and the longevity, while in (B) it was observed changes in the egg-adult cycle, the number of parasitized eggs, the percentage of emerged adults and the sexual ratio. In the immature stages there were no evidence of infection by entomopathogenic fungi (ML). 3) Virulence to *B. tabaci*: Isolates were sprayed ( $1.0 \times 10^5$  to  $1.0 \times 10^9$  conidia/mL) on third instar nymphs of *B. tabaci* and then evaluations were made on confirmed mortality and the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>). It was observed that the isolates Unioeste 47 and IBCB 367 caused the highest mortality rates (84,1 e 98,6%) and had the lowest LC<sub>50</sub> ( $4,1 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL).

**Key-words:** Parasitoid. Non-target organism. Whitefly. Biological control. Pathogenicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Formação do tubo de germinação dos fungos entomopatogênicos sobre o corpo de *T. pretiosum*. A e B) isolado IBCB 367 de *Isaria* sp.. C, D e E) isolado Esalq 09 de *M. anisopliae* F) isolado Unioeste 47 de *B. bassiana*. a) conídio em germinação b). formação do apressório. PT: protórax ventral; AA: asa anterior; CB: cabeça; AP: articulação da perna .....62
- Figura 3.2** – Microscopia de Luz. A) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com ovos pulverizados com a solução testemunha. B, C e D) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com ovos pulverizados com *Isaria* sp. (IBCB 367). a) olhos b) aparelho bucal c) pernas d) asas e) antenas f) tórax g) abdome h) conídios i) fiálides.....64
- Figura 3.3** – Microscopia de Luz. A) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com ovos pulverizados com a solução testemunha. B, C e D) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com com ovos pulverizados com *Isaria* sp. (IBCB 394). a) olhos b) aparelho bucal c) pernas d) asas e) antenas f) tórax g) abdome h) conídios i) fiálides j) hifas .....65
- Figura 4.1** – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A) *B. bassiana* Unioeste 47, conídios aderidos à mandíbula e B) conídios aderidos à região ventral da cabeça; C) *B. bassiana* Unioeste 57 conídio aderido ao tórax ventral; D) *M. anisopliae* Esalq 09, conídios aderidos à dobra da asa; E) *Isaria* sp. IBCB 367, conídios aderidos à região intersegmentar; F) *Isaria* sp. IBCB 394 conídios aderidos à dobra da asa abaixo do sensilo tricóideo..... 101

**Figura 4.2** – Microscopia de Luz. Análise histológica de ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados por *Trichogramma pretiosum*, mas que não apresentaram a emergência do parasitóide. Estruturas histológicas observadas e indicadas: a) córion dos ovos do hospedeiro (*A. kuheniella*). b) cabeça, c) tórax e d) abdome de *T. pretiosum* em fase embrionária. Tratamentos: A) Testemunha – fase pré-pupa. B) Testemunha – fase pupa/emergência. C) *M. anisopliae* Unioeste 43. D) *M. anisopliae* Esalq 09. E) *B. bassiana* Unioeste 47 ..... 103

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e suas respectivas origens .....36
- Tabela 3.2** – Porcentagem ( $\pm$ EP) de ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados por *Trichogramma pretiosum* com chance de escolha entre ovos pulverizados com fungos entomopatogênicos ou testemunha (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase) .....44
- Tabela 3.3** – Número de ovos ( $\pm$  EP) de *Anagasta kuehniella*, pulverizados com fungos entomopatogênicos previamente ou posteriormente ao parasitismo por *Trichogramma pretiosum* (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase) .....46
- Tabela 3.4** – Porcentagem ( $\pm$  EP) de adultos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos prévia ou posteriormente ao parasitismo (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase) .....49
- Tabela 3.5** – Razão sexual ( $\pm$  EP) de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos prévia ou posteriormente ao parasitismo (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase) .....51
- Tabela 3.6** – Período ovo-adulto ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* criados em ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos, prévia ou posteriormente ao parasitismo, (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase) .....53
- Tabela 3.7** – Longevidade ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos, prévia ou posteriormente ao parasitismo, (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase) .....55

<b>Tabela 3.8</b> – Porcentagem ( $\pm$ EP) de mortalidade confirmada de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> tratados com fungos entomopatogênicos pré e pós-parasitismo, (temp. $26 \pm 2$ °C e 14 h de fotofase) .....	57
<b>Tabela 3.9</b> – Longevidade ( $\pm$ EP) de fêmeas de <i>Trichogramma pretiosum</i> que parasitaram ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> pulverizados com fungos entomopatogênicos, sem chance de escolha, (temp. $26 \pm 2$ °C e 14 h de fotofase) .....	59
<b>Tabela 4.1</b> – Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios e respectiva origem.....	75
<b>Tabela 4.2</b> – Porcentagem ( $\pm$ EP) de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> , pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes períodos após o parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase) .....	81
<b>Tabela 4.3</b> – Razão sexual ( $\pm$ EP) de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> , pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos após o parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase) .....	84
<b>Tabela 4.4</b> – Período ovo-adulto ( $\pm$ EP) de fêmeas e machos de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> , pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos após o parasitismo ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase) .....	86
<b>Tabela 4.5</b> – Longevidade ( $\pm$ EP) de fêmeas e machos de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> , pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos após o parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase).....	88
<b>Tabela 4.6</b> – Número de ovos ( $\pm$ EP) de <i>Anagasta kuehniella</i> parasitados por <i>Trichogramma pretiosum</i> , pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase) .....	90

<b>Tabela 4.7</b> – Porcentagem ( $\pm$ EP) de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase).....	93
<b>Tabela 4.8</b> – Razão sexual ( $\pm$ EP) de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase).....	95
<b>Tabela 4.9</b> – Período ovo-adulto ( $\pm$ EP) de fêmeas e machos de <i>Trichogramma pretiosum</i> desenvolvidos em ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> tratados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase).....	97
<b>Tabela 4.10</b> – Longevidade ( $\pm$ EP) de fêmeas e machos de <i>Trichogramma pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase).....	99
<b>Tabela 5.1</b> – Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e respectiva origem.....	113
<b>Tabela 5.2</b> – Mortalidade confirmada (%) ( $\pm$ EP) de <i>Bemisia tabaci</i> pulverizadas com fungos entomopatogênicos. Temp. $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase.....	116
<b>Tabela 5.3</b> – Estimativa da deviance (função desvio) de cada modelo encaixado com seus respectivos graus de liberdade, considerando o modelo Binomial com função de ligação probit, estimativa dos parâmetros do modelo, considerando o modelo Binomial com função de ligação probit.....	121
<b>Tabela 5.4</b> – Concentração Letal média (CL50) de isolados de fungos entomopatogênicos a <i>B. tabaci</i> Temp. $26 \pm 2$ °C e 14 horas de fotofase.....	122

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 A CULTURA DO TOMATE <i>Lycopersicon esculentum</i> MILL. ....	20
2.2 INSETOS-PRAGA ASSOCIADOS À CULTURA DO TOMATE .....	21
2.2.1 Traça-do-Tomateiro <i>Tuta absoluta</i> Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) .....	21
2.2.1.1 <i>Trichogramma pretiosum</i> riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) .....	22
2.2.2 Mosca-Branca <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae).....	25
2.2.2.1 Fungos entomopatogênicos .....	26
2.3 INTERAÇÃO DOS MÉTODOS DE CONTROLE UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATE .....	28
2.3.1 Interação entre <i>Trichogramma pretiosum</i> e Inseticidas .....	28
2.3.2 Interação entre <i>Trichogramma pretiosum</i> e Extratos Vegetais .....	29
2.3.3 Interação entre <i>Trichogramma pretiosum</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	30
2.3.4 Interação entre <i>Trichogramma</i> spp. e Fungos Entomopatogênicos .....	30
<b>3 ARTIGO A – SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A <i>Trichogramma pretiosum</i> RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)</b> .....	32
3.1 RESUMO .....	32
3.2 INTRODUÇÃO .....	33
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.3.1 Obtenção de Colônias Monospóricas dos Isolados .....	35
3.3.2 Preparação das Suspensões de Fungos Entomopatogênicos .....	36
3.3.3 Obtenção de <i>Anagasta kuehniella</i> e de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	37
3.3.4 Repelência Provocada pelo Fungo ao Parasitismo de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	37
3.3.5 Efeito da Pulverização dos Fungos Antes e Após o Parasitismo .....	38
3.3.5.1 Ovos pulverizados pré-parasitismo .....	38
3.3.5.2 Ovos pulverizados pós-parasitismo .....	39

3.3.6 Ação dos Fungos Entomopatogênicos sobre Adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	40
3.3.7 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) .....	40
3.3.7.1 Obtenção e preparo das amostras .....	40
3.3.7.2 Processamento das amostras e análises .....	40
3.3.8 Análise Histológica de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	41
3.3.8.1 Obtenção e preparo das amostras .....	41
3.3.8.2 Processamento histológico e análise das amostras .....	41
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.4.1 Seletividade de Fungos Entomopatogênicos a <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	43
3.4.1.1 Repelência provocada pelo fungo ao parasitismo de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	43
3.4.1.2 Efeito da pulverização dos fungos antes e após o parasitismo .....	45
3.4.1.3 Ação dos fungos entomopatogênicos sobre adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	58
3.4.2 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) .....	61
3.4.3 Análises Histológicas de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	63
3.5 CONCLUSÕES .....	67
3.6 REFERÊNCIAS .....	67

<b>4 ARTIGO B – AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PULVERIZADOS EM DIFERENTES TEMPOS SOBRE <i>Trichogramma pretiosum</i> RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)</b> .....	<b>71</b>
4.1 RESUMO .....	71
4.2 INTRODUÇÃO .....	72
4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	74
4.3.1 Obtenção de Colônias Monospóricas dos Isolados .....	74
4.3.2 Preparação das Suspensões de Fungos Entomopatogênicos .....	76
4.3.3 Obtenção de <i>Anagasta kuehniella</i> e <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	76
4.3.4 Fungos Entomopatogênicos Pulverizados em Diferentes Tempos sobre Ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> já Parasitados por <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	76

4.3.5 Fungos Entomopatogênicos, Aplicados em Ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> , Previamente ao Parasitismo por <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	77
4.3.6 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) .....	78
4.3.6.1 Obtenção e preparo das amostras .....	78
4.3.6.2 Processamento das amostras e análises .....	78
4.3.7 Processamento das Amostras e Análises Histológicas de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	79
4.3.7.1 Obtenção e preparo das amostras .....	79
4.3.7.2 Processamento histológico e análise das amostras .....	79
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
4.4.1 Fungos Entomopatogênicos Pulverizados em Diferentes Tempos sobre Ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> já Parasitados por <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	80
4.4.2 Ação de Fungos Entomopatogênicos, Aplicados em Ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> , Previamente ao Parasitismo por <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	88
4.4.3 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) .....	100
4.4.4 Análises Histológicas de <i>Trichogramma pretiosum</i> .....	102
4.5 CONCLUSÕES .....	105
4.6 REFERÊNCIAS .....	105

<b>5 ARTIGO C – VIRULÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A NINFAS DE MOSCA BRANCA <i>Bemisia tabaci</i>. (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)</b> .....	109
5.1 RESUMO .....	109
5.2 INTRODUÇÃO .....	110
5.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	112
5.3.1 Patogenicidade e Virulência dos Fungos Entomopatogênicos a Mosca Branca <i>Bemisia tabaci</i> . .....	112
5.3.1.1 Cultivo de couve <i>Brassica oleracea</i> .....	112
5.3.1.2 Coleta e criação de <i>Bemisia tabaci</i> .....	112
5.3.1.3 Multiplicação e preparação das suspensões dos isolados .....	113
5.3.1.4 Patogenicidade de isolados para controle de mosca branca .....	114

5.3.1.5 Estimativa da concentração letal média (CL50) .....	115
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	116
5.4.1 Patogenicidade de Isolados para Controle de Mosca Branca .....	116
5.4.2 Estimativa da Concentração Letal Média (CL50) .....	120
5.5 CONCLUSÕES .....	124
5.6 REFERÊNCIAS .....	124
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>128</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>129</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tomate, além de estar entre as hortaliças de maior importância no Brasil, também é fonte de emprego e renda para agricultores de pequeno e médio porte. No entanto, essa cultura é suscetível a muitas pragas que danificam a planta, levando ao uso excessivo de inseticidas, pois os insetos estão direta ou indiretamente relacionados aos danos e a má aparência do fruto. Exemplo disso, são os índices apresentados pela Anvisa para o ano de 2007, em que o tomate apresentou o maior número de amostras irregulares referentes aos resíduos de agrotóxicos<sup>1</sup>, sendo 45% do total das amostras classificadas como insatisfatórias. Nestas amostras foram detectados teores de resíduos acima do permitido, além do uso de agrotóxicos não autorizados para esta cultura (ANVISA, 2008).

No entanto, há na sociedade o anseio por alimentos cada vez mais “limpos” e de qualidade, com isso, os sistemas orgânicos de cultivo vêm se destacando na produção de alimentos. Porém, tanto o sistema orgânico de produção de tomate quanto o convencional sofrem com o ataque da traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), que provoca danos em todas as fases de desenvolvimento da cultura e em várias estruturas da planta. Em alguns sistemas de produção, esse inseto vem sendo controlado, ainda na fase de ovo, com a liberação do parasitóides de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), controle este utilizado com eficiência por produtores na região oeste do estado do Paraná (PIETROWSKI<sup>2</sup>, 2010 - informação verbal). Segundo Medeiros; Vilela; França (2006) esse tipo de controle, utilizando *T. pretiosum*, evidencia ação econômica significativa (13,68% de aumento de no custo/benefício)

Além de *T. absoluta*, a mosca branca, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) também é considerada uma das principais pragas na cultura do tomate, e pode provocar danos diretos e/ou indiretos. O controle mais comum para esse inseto é o uso de inseticidas, levando a problemas de contaminação ambiental, dos

---

<sup>1</sup> Dados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em parceria com as Secretarias Estaduais de Saúde.

<sup>2</sup> Professora Dra. Vanda Pietrowski. Laboratório de Controle Biológico. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Marechal Cândido Rondon.

alimentos e do agricultor. No entanto, alternativas ao controle químico vêm sendo estudadas, sendo a produção e utilização dos fungos entomopatogênicos uma estratégia em potencial. Dentre os fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Isaria* sp. (Wise) Brown e Smith são considerados importantes agentes biológicos de controle, sendo encontrados no campo atacando diversas ordens de insetos, além de serem relatados como eficientes no controle de *B. tabaci*.

Entretanto, a utilização desses agentes de controle desperta preocupação sobre os possíveis efeitos em organismos não-alvo, de ocorrência natural ou utilizados e aplicados no controle de pragas, principalmente os inimigos naturais, incluindo *T. pretiosum*. Apesar dessa preocupação, poucos estudos avaliaram interações entre fungos entomopatogênicos e inimigos naturais, em especial *T. pretiosum*.

Estas interações, entre os agentes de controle microbiano e inimigos naturais, podem acontecer pela interferência nos parâmetros biológicos ou no comportamento. Porém, esses efeitos podem ser evitados ou minimizados através da seleção de isolados e do emprego de estratégias de controle a campo. Tendo conhecimento da eficiência desses fungos e do parasitóide em campo, e sabendo da necessidade de algumas vezes serem empregados concomitantemente, avaliou-se os efeitos de fungos entomopatogênicos sobre *T. pretiosum* e o controle realizado por esses sobre *B. tabaci*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO TOMATE *Lycopersicon esculentum* MILL.

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma planta herbácea da família Solanácea, originária da Cordilheira dos Andes, tendo os primeiros registros de produção no Brasil em meados da década de 30, com o início do Cinturão Verde de São Paulo (CAMARGO FILHO et al., 1994). No Brasil, o tomate tornou-se a segunda hortaliça em importância, sendo a maior parte da produção destinada à mesa (FILGUEIRA, 2003). A produção e o consumo de tomate, *in natura* ou industrializado, ocorrem em numerosos estados brasileiros. Na safra 2009/2010, a produção de tomate do Paraná chegou a 226.091 toneladas, tendo um aumento de 16% em relação à safra do ano anterior (PARANÁ-SEAB, 2010a).

Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul concentram 19% da produção de tomate destinado à mesa. O tomate de mesa representou 60% da produção total no Brasil no biênio 2005/2006, quando atingiu 2,4 milhões de toneladas por ano. Nesse mesmo período, a produtividade desta cultura aumentou em 31%, indicando adoção de novas tecnologias na produção (CAMARGO; CAMARGO FILHO, 2008).

No Brasil, a cultura do tomate tem ainda elevada importância socioeconômica, sendo base da agricultura familiar, de pequenos agricultores e de agricultores de porte médio, além de ser um alimento rico em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas (MEDEIROS; VILELA; FRANÇA, 2006). Apesar disso, o tomate está entre as culturas com maior risco econômico (FILGUEIRA, 2003), estando relacionada com uma diversidade de doenças (FILGUEIRA, 2003; NAIKA et al., 2006) e pragas (GALLO et al., 2002; FILGUEIRA, 2003; NAIKA et al., 2006), entre as quais destacam-se a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick, Lepidoptera: Gelechiidae) e a mosca-branca *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae).

A capacidade de injúria provocada por essas pragas, aliada às exigências de qualidade do produto pelos consumidores, induzem a um número

expressivo de aplicações de agrotóxicos, elevando os custos de produção, de danos ao ambiente, ao consumidor e ao produtor, pelos resíduos deixados (LEITE, 2004). Assim, uma das alternativas proposta para este problema é a utilização do controle biológico de pragas e doenças. Os produtores que empregam essa tática de controle, produzindo de forma orgânica, podem conseguir uma certificação que permite a venda de seus produtos com maior valor agregado, aumentando os rendimentos em relação à produção convencional (NAIKA et al., 2006).

## 2.2 INSETOS-PRAGA ASSOCIADOS À CULTURA DO TOMATE

A cultura do tomate tem sido uma atividade lucrativa para os produtores do estado do Paraná, no entanto, esta cultura sofre com o ataque de insetos, que além dos danos diretos provocados podem ainda ser vetores de doenças. Dentre estes, a traça do tomateiro *T. absoluta* e a mosca branca *B. tabaci* são pragas em potencial em todas as regiões produtoras, causando prejuízos aos agricultores. A importância da mosca-branca vem aumentando consideravelmente, uma vez que a traça já vem sendo controlada pelo parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), usado em associação com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner (ZUCCHI; MONTEIRO, 1997; GALLO et al., 2002; HAJI et al., 2002).

### 2.2.1 Traça-do-Tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae)

Na fase imatura da traça-do-tomateiro *T. absoluta*, fase em que o inseto é considerado praga, suas lagartas apresentam coloração inicial branca e posteriormente verde, com uma mancha parda no dorso. Nessa fase de desenvolvimento, penetram na folha, fruto e ápice das hastes, se alimentando do interior da planta, até se transformarem em pupa. Os adultos são mariposas cinzas ou prateadas de 9 a 10 mm, com asas franjadas nos bordos posteriores. A postura é

realizada principalmente no terço superior das plantas (HAJI, 1997; GALLO et al., 2002; HAJI et al., 2002). *T. absoluta* ocorre durante todo o período da cultura, destruindo brotações novas e frutos, que se tornam depreciados para comercialização (GALLO et al., 2002; HAJI et al., 2002). Essa praga foi descrita pela primeira vez no Brasil no Submédio do Vale do São Francisco, no final de 1981 (HAJI et al., 2002).

Os controles recomendados para essa praga são a eliminação de plantas hospedeiras, rotação de cultura, plantio de sorgo gramífero para atração de predadores, destruição dos restos culturais e monitoramento com feromônios. O controle mecânicos pode ser realizado pela limpeza nas caixas usadas na colheita e nos veículos de carga. Para o controle químico recomenda-se inseticidas do grupo dos piretróides, diacilhidrazina e organofosforados (GALLO et al., 2002; COSTA; PERIOTO; 2006; PARANÁ-SEAB, 2010b).

Apesar das recomendações para o controle químico, o controle biológico tem eficiência acima de 80% em tomate estaqueado, utilizando liberações inundativas de *T. pretiosum* (para controlar a praga na fase de ovo) conjuntamente com aplicações de *B. thuringiensis* (para controle da fase larval) (GALLO et al., 2002). Desta forma verifica-se a importância de um programa de manejo desta praga empregando associações com o parasitóide de ovos *T. pretiosum*.

#### 2.2.1.1 *Trichogramma pretiosum* riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Os insetos do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) apresentam corpo compacto com tamanho entre 0,2 e 1,5 mm na fase adulta, em cuja fase, alimentam-se de néctar e exsudados do hospedeiro e da planta. As fêmeas podem colocar de 20 a 120 ovos, sendo os mesmo colocados no interior de ovos do hospedeiro, sendo normalmente um ovo do parasitóide por ovo do hospedeiro. O período ovo-adulto pode variar de seis a 10 dias, dependendo da temperatura, ambiente e hospedeiro parasitado (PINTO, 1997).

Nas fases imaturas, o parasitóide desenvolve-se no interior do ovo do hospedeiro, do qual se alimenta. O ovo do hospedeiro parasitado por *T.*

*pretiosum* pode ser identificado, mais precisamente, quando o parasitóide encontra-se na fase de pré-pupa, pois ocorre a deposição de sais de urato no abdome, tornando o ovo enegrecido (CÔNSOLI; ROSSI; PARRA, 1999). Quando completamente formado, o adulto de *Trichogramma* emerge do ovo do hospedeiro. Os adultos apresentam dimorfismo sexual, observado pela morfologia das antenas, sendo a antena das fêmeas com clava simples (clavada) e a dos machos com os segmentos do funículo e da clava fundidos numa única estrutura alongada (filiforme com cerdas) (PINTO, 1997).

As espécies de parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* são mais utilizadas que qualquer grupo de entomófagos no controle de insetos-praga, pois atacam as ordens Lepidoptera, Hemiptera e Coleoptera. Devido a essa associação e sua importância prática, já foram descritas, aproximadamente, 30 espécies desse gênero na América do Sul, sendo *T. pretiosum* uma das espécies encontradas no Brasil e a mais amplamente distribuída, associada a 26 espécies de hospedeiros (PINTO, 1997; ZUCCHI; MONTEIRO, 1997; HAJI et al., 2002; PARRA et al., 2002). O caso mais relevante de controle biológico aplicado, com a utilização de *Trichogramma* no Brasil, refere-se ao uso de *T. pretiosum* para controle da traça-do-tomateiro, sendo que os primeiros trabalhos com esse parasitóide ocorreram na região do Submédio do Vale do São Francisco, local onde *T. absoluta* foi descrita pela primeira vez (HAJI, 1997; HAJI et al., 2002; PARRA; ZUCCHI, 2004; COSTA; PERIOTO, 2006).

O controle de pragas por *T. pretiosum* está associado aos odores dos ovos do hospedeiro, feromônio do hospedeiro adulto e odor da planta (químicos voláteis), que auxiliam na seleção do hospedeiro pelo parasitóide. O ovo do hospedeiro é identificado por *T. pretiosum*, bem como sua condição e seu valor nutricional. O ovo é submetido a uma inspeção, que é realizada pelo caminhar da fêmea, para frente e para trás, sobre sua superfície, enquanto ele é continuamente tocado pelas suas antenas, percebendo formato, textura e substâncias químicas (VINSON, 1997; CÔNSOLI; VINSON, 2009).

Essa inspeção é seguida pelo processo de oviposição, em que *T. pretiosum* faz movimentos para baixo e para cima com o ovipositor. Durante esse processo, *T. pretiosum* avalia a qualidade interna do hospedeiro, que na fase de ovo é rica em nutrientes (VINSON, 1997; MAGALHÃES; MONNERAT; ALVES, 1998).

Com isso, pode-se verificar que o parasitismo depende de decisões acertadas das fêmeas, visto que o parasitóide, nas fases imaturas, não terá condições de explorar outros hospedeiros alternativos. Esse tipo de parasitismo, na fase de ovo, em que ocorre paralisia do hospedeiro, classifica *T. pretiosum* como um parasitóide idiobionte (CÔNSOLI; VINSON, 2009)

Durante o processo de oviposição, o tamanho, volume e valor nutricional do ovo do hospedeiro determinam a quantidade de ovos colocados pela fêmea de *T. pretiosum* no seu interior. Nos ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), somente um ou, raramente, dois ovos são colocados, por serem hospedeiros pequenos (VINSON, 1997).

Ainda segundo Vinson (1997), após a determinação das condições nutricionais do hospedeiro e a adequabilidade, o próximo passo é a escolha do sexo, que é controlado pela fêmea na oviposição. A escolha do sexo pode ser influenciada por diversos fatores, sendo o principal a qualidade do hospedeiro. Assim, nos ovos maiores e com disponibilidade de nutrientes, são colocados ovos que darão origem a fêmeas, mais exigentes nutricionalmente, enquanto que nos ovos com condições nutricionais menos favoráveis, já parasitados, ou com algum tipo de substância tóxica ou repelente, são colocados ovos que darão origem a machos, pois eles possuem menores exigências nutricionais. A razão sexual pode ser determinada de duas formas, uma é selecionando o sexo antes da oviposição, como descrito anteriormente, e a outra é a postura, no mesmo ovo do hospedeiro, de um ovo que dará origem a um macho e outro que dará origem a uma fêmea, sendo que a competição entre eles é que irá determinar quem sobreviverá (VINSON, 1997).

A eficiência do parasitóide no controle de *T. absoluta* pode ser constatada em trabalhos realizados, como o de Haji (2002). A autora verificou redução de 55% nos danos de *T. absoluta* nas áreas de emprego de MIP, com liberações de *T. pretiosum*, quando comparadas às áreas em que foi utilizado o controle convencional. Também, Parra et al. (2002) verificaram o controle de *T. absoluta* por *T. pretiosum* em casa de vegetação, com resultados satisfatórios, ressaltando a viabilidade de utilização de *T. pretiosum* na cultura do tomate rasteiro e estaqueado.

### 2.2.2 Mosca-Branca *Bemisia Tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

As moscas-brancas *B. tabaci* (Genn.) e *Bemisia tabaci* biótipo B (Bellows e Perring) são pequenos insetos pertencentes à ordem Hemiptera, Subordem Sternorrhyncha, Família Aleyrodidae. Os adultos são brancos com comprimento de 1-2 mm, apresentam quatro asas membranosas cobertas com substância pulverulenta branca. Os ovos são colocados na face abaxial das folhas, de onde eclodem as ninfas que, inicialmente, apresentam movimento e após encontrar um local adequado, fixam-se e passam a sugar a seiva das folhas, sendo o período completo em torno de 15 dias (GALLO et al., 2002; NAIKA et al., 2006).

Entre 1972 e 1973 ocorreram altos níveis de infestação de mosca-branca no norte do estado do Paraná, estando esse aumento relacionado ao aumento na produção da soja, que é hospedeira desse inseto (GALLO et al., 2002). Um novo biótipo, conhecido como *Bemisia tabaci* biótipo B, foi relatada em 2002, sendo considerada mais nociva à agricultura. Ambas são pragas polípagas, encontradas na cultura do algodão, melão, melancia, abóbora, feijão, batata, hortaliças, ornamentais, soja, videira, maracujá e principalmente tomate (GALLO et al., 2002; LOURENÇÃO, 2002), constituindo um problema durante a estação seca, diminuindo e até desaparecendo quando começa a estação das chuvas, demonstrando, porém, fácil adaptação (NAIKA et al., 2006).

As moscas-brancas causam dois tipos de danos: os diretos, ocasionados pela sucção de seiva que provoca redução no vigor da planta e, os indiretos, pelo aparecimento de fumagina que pode dificultar a fotossíntese. Além desses, também estão relacionadas à transmissão do vírus do grupo geminivírus, que provoca nanismo acentuado, enrugamento severo das folhas terminais e amarelecimento da planta (LOURENÇÃO; YUKI; ALVES, 1999; GALLO et al., 2002; ANDERSON; MARKHAM, 2004; CARDONA et al., 2005).

Para controle das moscas-brancas, recomenda-se o uso de armadilhas adesivas amarelas com o objetivo de diminuir e monitorar os insetos adultos, controle químico com inseticidas do grupo dos neonicotinóides, tiadiazinona, piretróides, éter piridiloxipropílico, benzoiluréia e feniltiouréia e testes ainda estão sendo realizados com o controle biológico utilizando os fungos entomopatogênicos

*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Viégas (GALLO et al., 2002; CARDONA et al., 2005; PARANÁ-SEAB, 2010b).

Os fungos entomopatogênicos estão sendo utilizados e ainda estudados como uma alternativa promissora ao uso de inseticidas na cultura de tomate, sendo avaliados isolados mais virulentos de *B. bassiana*, *L. lecanii*, *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown e Smith e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (LOURENÇÃO; MIRANDA; ALVES, 2001; VAZQUEZ-MORENO, 2002; RAMOS et al., 2004). A vantagem dos fungos entomopatogênicos, quando comparados aos inseticidas, é que os fungos podem permanecer no ambiente e ocasionar epizootias, pois permitem a contaminação de outros insetos da mesma espécie que ocupam o mesmo ambiente, através da disseminação pelo vento ou através do contato.

#### 2.2.2.1 Fungos entomopatogênicos

Os fungos são organismos de forma e tamanho variáveis, sendo constituídos por um conjunto filamentosos de micélios composto pelas hifas (células), cuja parede é constituída de quitina e/ou celulose (ALVES, 1998a; 1998b; LEITE et al, 2003). Segundo Alves (1998a), os fungos podem atacar as mais diversas fases de desenvolvimento do inseto, sendo altamente virulentos e com penetração via tegumento, o que pode ser uma vantagem quando comparados a outros tipos de entomopatógenos que penetram via oral, principalmente no controle de insetos sugadores. Além disso, os conídios dos fungos têm alta capacidade de dispersão horizontal, sendo transportados por vários agentes a grandes distâncias.

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. Para que o ciclo ocorra existe uma sequência de etapas a iniciar pela adesão e germinação do fungo sobre o corpo do hospedeiro, que depende de condições favoráveis, formação do apressório e grampo de penetração. Após a penetração, inicia-se a colonização do hospedeiro e a reprodução do patógeno, que culmina com a emergência das hifas e disseminação do fungo (ALVES, 1998b; ALMEIDA; MACHADO; 2006). Nesse ciclo, estão

envolvidos os processos de produção de enzimas e toxinas pelos fungos. Segundo Alves (1998b), as enzimas produzidas por esses patógenos podem estar relacionadas com os processos de especificidade, enquanto as toxinas estão relacionadas à virulência.

Utilizando fungo para o controle de mosca branca, Vidal et al. (1998) verificaram mortalidade de *B. tabaci* biótipo B superior a 70% com *I. fumosorosea*<sup>3</sup>. Wraight et al. (2000) estudando a virulência de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* sobre essa mesma espécie em curcubitáceas, verificaram 90% de mortalidade. Epizootias de fungos também são observadas, como a epizootia de *L. lecanii* na cultura da soja, no estado do Maranhão, em 1999, infectando ninfas de *B. tabaci* biótipo B e reduzindo significativamente a população desta espécie (LOURENÇÃO; MIRANDA; ALVES, 2001).

Em laboratório, isolados de *B. bassiana* controlaram em mais de 90% ninfas de *B. tabaci* biótipo B, sendo que os isolados coletados da própria ordem Hemiptera foram os mais virulentos (VICENTINI; FARIA; OLIVEIRA, 2001). Mortalidade acima de 85% também foi verificada em *T. vaporariorum* em cultivo de tomate tratado com *L. lecanii* (FARGUES et al., 2003). *Lecanicillium muscarium* provocou mortalidade em 90% das ninfas de *B. tabaci* biótipo B, em condições de laboratório, e a campo a mortalidade ficou acima de 80% (CUTHBERTSON; WALTERS, 2005).

Na comparação entre espécies de fungos James; Buckner; Freemanc (2003) verificaram que ninfas de 2<sup>o</sup> ínstar de *B. tabaci* biótipo B são mais suscetíveis a *B. bassiana*, enquanto para *I. fumosorosea* as mais suscetíveis são as ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar. Verificaram ainda, que todas as espécies de mosca-branca no 4<sup>o</sup> ínstar são menos suscetíveis aos fungos entomopatogênicos.

A utilização de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de uma determinada praga-alvo, pode gerar efeitos imediatos sobre a mesma, sobre espécies próximas a esta, que ocupam o mesmo habitat, ou mesmo sobre espécies relacionadas na cadeia trófica, como parasitóides, predadores e decompositores (SOSA-GÓMEZ; PEREIRA; ALVES, 1998).

---

<sup>3</sup> Conforme classificação atual por Hodge et al. (2005) e Humber (2007), classificado anteriormente como pertencente ao gênero *Paecilomyces* sp.

Apesar disto, a utilização de um fungo entomopatogênico com um parasitóide pode melhorar a eficiência do controle biológico, por atuarem em diferentes insetos-praga da mesma cultura, ou em um mesmo inseto-praga, mas em diferentes fases de desenvolvimento. Como exemplo na cultura do tomate, em que o parasitóide *T. pretiosum* controla *T. absoluta* na fase de ovo e os fungos entomopatogênicos controlam *B. tabaci*. Desse modo, justifica-se a interação desses agentes de controle na cultura do tomate.

### 2.3 INTERAÇÃO DOS MÉTODOS DE CONTROLE UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATE

Vários trabalhos de seletividade de inseticidas a *T. pretiosum* foram realizados, seguindo ou não as normas preconizadas pela “International Organization for Biological Control and Integrated Noxious Animals and Plants/ West Palaearctic Regional Section” (IOBC/WPRS), a fim de verificar a possível interação entre métodos de controle em programas de manejo, sobre organismos não-alvos. Contudo, especificamente em relação à interação de *T. pretiosum* e fungos entomopatogênicos, há poucas informações, sendo estas importantes para os agricultores que visam à utilização desses dois agentes na cultura do tomate, por vezes, na mesma época.

#### 2.3.1 Interação entre *Trichogramma pretiosum* e Inseticidas

O interesse por *Trichogramma* spp. para o controle biológico está aumentando, considerando-se que trabalhos de controle integrado, com *Trichogramma* e inseticidas estão sendo realizados a mais de 50 anos, pois para métodos integrados de controle químico e controle biológico é necessário que os inseticidas sejam seletivos aos inimigos naturais. Com esse objetivo, Jacobs; Kousklekas; Gross (1954) testaram a seletividade de inseticidas a *T. pretiosum* e observaram que resíduos de permetrina e endosulfan causaram diminuição no

parasitismo de *T. pretiosum* e aumento na mortalidade deste parasitóide. Amayan (1982) observou que alguns inseticidas apresentaram efeito residual de 48 h para *T. pretiosum*, enquanto outros, mesmo após 72 h, chegavam a provocar mortalidade total dos parasitóides.

O inseticida Paration-metil (Folidol 60 CE) foi altamente tóxico a *T. pretiosum*, reduzindo significativamente sua capacidade de parasitismo (RAMALHO; SILVA; JESUS, 1989). Abamectina, metamidofós e cartap reduziram o parasitismo, mesmo quando aplicados sete dias previamente ao parasitismo, enquanto lambdacialotrina reduziu o parasitismo por até 31 dias (CARVALHO; PARRA; BAPTISTA, 1999). A mistura abamectina + óleo mineral provocou redução na emergência de adultos de *T. pretiosum*, quando aplicada previamente ao parasitismo e também quando aplicada 48 h após o parasitismo (CIOCIOLA JÚNIOR et al., 1999).

Dentre os inseticidas utilizados na produção integrada de pêssego, carbaril, dimetoato e triclorfom foram nocivos à adultos de *T. pretiosum*, reduzindo a capacidade de parasitismo (GIOLO et al., 2005). Clorfenapir, inseticida recomendado para a cultura do tomate, reduziu em 50% o parasitismo da geração F1 de *T. pretiosum* (MOURA; CARVALHO; RIGITANO, 2005), e cartap foi o menos seletivo sobre as fases imaturas desse parasitóide (MOURA et al., 2006). Bueno et al. (2008) testaram 19 agrotóxicos quanto à seletividade a *T. pretiosum* e verificaram que apenas dois desses foram seletivos (classe 1) para as fases imaturas (ovos, larva e pupa). Com isto, verifica-se a necessidade de fazer os testes de seletividade tanto para a fase adulta quanto para as fases imaturas, e tanto para produtos químicos quanto para produtos de origem biológica.

### 2.3.2 Interação entre *Trichogramma Pretiosum* e Extratos Vegetais

Extratos vegetais e óleos utilizados no sistema orgânico não podem ser considerados totalmente seguros, frente a isto, alguns estudos foram e estão sendo realizados a fim de verificar a seletividade destes a *T. pretiosum*. O óleo de nim *Azadirachta indica* (Juss.) não foi seletivo a *T. pretiosum*, sendo que o mesmo

interferiu negativamente no parasitismo e na longevidade das fêmeas que efetuaram o parasitismo (OLIVEIRA; PRATISSOLI; BUENO, 2003). Da mesma forma, extratos de *A. indica* foram repelentes a *T. pretiosum*, reduzindo o número de ovos parasitados e a emergência do parasitóide (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIN, 2004). Também, extratos de Asteraceae, *Lepidaploa lilacina* (Former) Rob. e *Ageratum fastigiatum* (Gardner) King e Rob., (plantas com propriedades inseticidas) provocaram mortalidade em *T. pretiosum* (TAVARES et al., 2009).

### 3.2.3 Interação entre *Trichogramma pretiosum* e *Bacillus thuringiensis*

Em algumas culturas ocorre a associação de *T. pretiosum* e *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para o controle de pragas. Nesse sentido, alguns trabalhos são realizados a fim de garantir a segurança deste microrganismo a *T. pretiosum*, mesmo sabendo que a infecção de *B. thuringiensis* ocorre por via oral. A seletividade de *B. thuringiensis* a *T. pretiosum* foi verificada quando o mesmo foi aplicado sobre as fases de desenvolvimento do parasitóide, não interferindo na emergência e no número de ovos parasitados (CARVALHO; PARRA; BAPTISTA, 2001). Da mesma forma, Haji et al. (2002), não relataram nenhum impacto desse microrganismo sobre o parasitóide *Trichogramma* sp. Assim, também para Dipel DF<sup>®</sup> (100g 100L-1), que foi considerado seletivo (<30% de redução no parasitismo) a *T. pretiosum* (MORANDI FILHO et al., 2006).

### 3.2.4 Interação entre *Trichogramma* spp. e Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos podem não ser seletivos, existindo a possibilidade de infecção direta sobre organismos não-alvos. Assim, os parasitóides podem estar suscetíveis a doenças causadas por fungos. No entanto, na maioria dos casos, os parasitóides não são infectados, mesmo assim, há a necessidade de se conhecer se as diferentes fases e estágios do parasitóide podem ser ou não

sensíveis ao fungo, e ainda, se existe a possibilidade de parasitóides e patógenos poderem competir pelos mesmos hospedeiros (MAGALHÃES; MONNERAT; ALVES, 1998; SOSA-GÓMEZ; PEREIRA; ALVES, 1998).

A fim de verificar este tipo de interação, Polanczyck et al. (2009) estudaram o efeito dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre as características reprodutivas e de sobrevivência de *T. pretiosum*, não observando interferência em ambas. Os mesmos autores propõem a possibilidade de realizar, em campo, a liberação de *T. pretiosum* após a pulverização dos fungos entomopatogênicos, visto que estes não afetaram a capacidade de parasitismo.

Contudo, em experimentos realizados por Potrich et al. (2009), com o objetivo de analisar a seletividade de fungos entomopatogênicos a *T. pretiosum*, foi verificado que *M. anisopliae* provocou diminuição na emergência de *T. pretiosum* e acarretou mortalidade confirmada das fêmeas que realizaram o parasitismo. Entretanto, *B. bassiana* não interferiu em nenhum dos parâmetros biológicos testados. Apesar das alterações provocadas por *M. anisopliae*, esses autores destacam que as alterações são mínimas quando comparadas às provocadas por inseticidas químicos, e que para isto, são necessários testes em semi-campo e campo.

A seletividade de fungos entomopatogênicos também foi testada sobre outras espécies de *Trichogramma*, como visto por Broglio-Micheletti; Santos; Pereira-Barros (2006). Nesse trabalho, os autores verificaram que *M. anisopliae* provocou redução no número de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) parasitados por *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), reduzindo também emergência e a longevidade da segunda geração.

*L. lecanii* também se apresentou seletivo, pois não interferiu no número de ovos parasitados, porcentagem de emergência (viabilidade), número de indivíduos por ovo, razão sexual e longevidade das fêmeas de *T. atopovirilia* que realizaram o parasitismo, confirmando a possibilidade de utilização simultânea em programas de controle biológico (DALVI et al., 2007). Efeitos negativos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* não foram observadas sobre características reprodutivas e de sobrevivência de *T. atopovirilia*, verificando a possibilidade de integração desses métodos (POLANCZYCK et al., 2009).

### 3 ARTIGO A – SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

#### 3.1 RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar a seletividade de fungos entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Foram utilizados dois isolados de cada um dos fungos entomopatogênicos: *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 e Unioeste 57), *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 e Esalq 09) e *Isaria* sp. (IBCB 367 e IBCB 394). Esses foram pulverizados, na concentração de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL, sobre cartelas (1,0 x 5,0 cm) contendo ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). A testemunha constou da pulverização de água destilada estéril contendo Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%). Realizou-se teste com chance de escolha para parasitismo, confinando uma fêmea de *T. pretiosum* com duas cartelas, uma pulverizada com o isolado e a outra com a testemunha, sendo avaliada a porcentagem de parasitismo. O teste sem chance de escolha consistiu em confinar uma fêmea com uma cartela pulverizada ou não pulverizada com os isolados. Avaliou-se o número de ovos parasitados, porcentagem de emergência, longevidade, duração do período ovo-adulto e razão sexual, além de avaliar a longevidade das fêmeas que realizaram o parasitismo e avaliar a mortalidade confirmada dos adultos emergidos. Verificou-se que os isolados provocaram repelência ao parasitismo de *T. pretiosum*, com exceção do IBCB 394. As pulverizações pré-parasitismo e pós-parasitismo não interferiram no número de ovos parasitados e na razão sexual, no entanto, ambos os tratamentos interferiram na porcentagem de adultos emergidos, período ovo-adulto e longevidade. Foi confirmada a presença de conídios em *T. pretiosum* através da Microscopia Eletrônica de Varredura e da Microscopia de Luz. Mesmo assim, os isolados não interferiram na longevidade das fêmeas que realizaram o parasitismo.

**Palavras-chave:** Organismos não-alvos. Parasitóide. “Side effect”. Biossegurança. Controle biológico.

#### SELECTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI TO *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

#### Abstract

This study aimed to evaluate the selectivity of the entomopathogenic fungi on *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Two isolates of each entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 and Unioeste 57),

*Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 and Esalq 09) and *Isaria* sp. (IBCB 367 and IBCB 394) were used. These were sprayed, on  $1.0 \times 10^9$  conidia/mL concentration, on cards (1.0 x 5.0 cm) containing *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) eggs. The control treatment was sprayed with sterile distilled water containing Tween<sup>®</sup> 80 (0.01%). For parasitism choice test, a female of *T. pretiosum* was confined with two cards, one sprayed with the isolate and the other with the control, for evaluation parasitism percentage. The no-choice test consisted of confining a female with one card sprayed or not sprayed with the isolates. It was evaluated the number of parasitized eggs, emergence percentage, longevity, egg-adult cycle and sex ratio, and the longevity of females that realized parasitism, and confirmed mortality of adults emerged. It was observed that isolates caused repellency to parasitism by *T. pretiosum*, except IBCB 394. The spraying previously to parasitism and after parasitism did not affect the number of parazited eggs and sex ratio, however, both treatments to affected the percentage of emerged adults, egg-adult cycle and longevity. Even though, the presence of isolates in *T. pretiosum* was confirmed by Scanning Electron Microscopy and Light Microscopy. Nevertheless, the isolates did not show any effects on female longevity that realizes parasitism.

**Keywords:** Non-target organisms. Parasitoids. Side-effect. Biosafety. Biological control.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Os parasitóides são inimigos naturais de insetos-praga e estão sendo amplamente utilizados para o controle biológico das ordens Lepidoptera, Hemiptera e Coleoptera, destacando os parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Dentre as pragas da cultura do tomate, destaca-se a traça-do-tomateiro ou *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (FILGUEIRA, 2003), cujo controle vem sendo realizado com liberações de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (GALLO et al., 2002; HAJI et al., 2002). Além disso, segundo Haji et al. (2002), este é o exemplo mais relevante de controle biológico aplicado com a utilização de *Trichogramma* no Brasil.

Contudo, a produção do tomate também é significativamente afetada pelas moscas-brancas *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Para o controle destes insetos-praga existem muitos trabalhos desenvolvidos e com resultados promissores com a utilização de fungos entomopatogênicos (FARIA; WRAIGHT;

2001; VICENTINI; FARIA; OLIVEIRA, 2001; RAMOS et al., 2004). Assim, esses agentes podem ser uma alternativa na agricultura.

Ente esses fungos entomopatogênicos, destacam-se as espécies *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Isaria* sp. (Wize) Brown e Smith e *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare e Gams, sendo encontradas no campo atacando diversas ordens de insetos, além de serem relatados vários trabalhos comprovando sua eficiência (ALVES, 1998; LORENÇÃO; MIRANDA; ALVES, 2001; VICENTINI; FARIA; OLIVEIRA, 2001).

A crescente utilização dos fungos entomopatogênicos tem gerado preocupações com relação aos seus efeitos nos organismos não-alvo, como os inimigos naturais (MAGALHÃES; MONNERAT; ALVES, 1998; SOSA-GÓMEZ; PEREIRA; ALVES, 1998). Um exemplo desses efeitos é o antagonismo observado na utilização conjunta de *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera: Aphelinidae) (parasitóide de mosca-branca) e *L. lecanii* para controle de *B. tabaci* biótipo B (JAZZAR; HAMMAD, 2003). Sendo assim, em vários países, os testes de seletividade de são obrigatórios, exigindo o uso de métodos aprovados internacionalmente, como os protocolos preconizados pela “International Organization for Biological Control and Integrated Noxious Animals and Plants/ West Palaearctic Regional Section” (IOBC/WPRS), o que permite a padronização e comparação dos resultados (HASSAN, 1997). Neste contexto, verifica-se que também são necessários estudos sobre a seletividade de fungos entomopatogênicos, utilizados para controlar mosca branca, sobre *T. pretiosum*, a fim de determinar a segurança da associação desses métodos utilizados na cultura do tomate e em outras culturas. Contudo, especificamente em relação à seletividade de fungos entomopatogênicos a *T. pretiosum*, há poucas informações disponíveis, as quais são importantes para a utilização conjunta, por vezes na mesma época, como é o caso da cultura do tomate.

Testes de seletividade de *L. lecanii* a *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner foram realizados por Dalvi et al. (2007), avaliando diferentes parâmetros, observando-se seletividade ao parasitóide. Por outro lado, Potrich et al. (2009) constataram seletividade de *B. bassiana* a *T. pretiosum*, no entanto, *M. anisopliae* afetou a emergência do parasitóide e provocou significativa mortalidade confirmada.

Deste modo, o conhecimento das interações dos agentes de controle, na utilização associada ou simultânea, pode aumentar a eficiência do controle biológico, ou evitar a sua redução. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar as interações entre fungos entomopatogênicos e *T. pretiosum*, avaliando diferentes parâmetros biológicos.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a seletividade de diferentes fungos entomopatogênicos sobre *T. pretiosum* foram realizados três experimentos sendo: a) Repelência de provocada pelo fungo ao parasitismo de *Trichogramma pretiosum*; b) Efeito da pulverização dos fungos antes e após o parasitismo; c) Ação dos fungos entomopatogênicos sobre adultos de *Trichogramma pretiosum*. Complementares aos testes de seletividade foram realizados dois estudos: a) Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura e b) Análise Histológica de *Trichogramma pretiosum*.

#### 3.3.1 Obtenção de Colônias Monospóricas dos Isolados

Foram utilizados isolados dos fungos *B. bassiana*, *Isaria* sp. e *M. anisopliae*, obtidos dos bancos de entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico/Instituto Biológico de Campinas (IBCB), Laboratório de Controle Microbiano/ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e do Laboratório de Biotecnologia Agrícola/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), sendo os isolados que apresentaram melhor produção em testes preliminares (**Tabela** ).

**Tabela 3.1** – Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e suas respectivas origens

<b>Isolados</b>	<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro original ou substrato</b>	<b>Local de origem</b>
Unioeste 43	<i>M. anisopliae</i>	Hymenoptera: Formicidae	São Miguel do Iguaçu/PR
Unioeste 47	<i>B. bassiana</i>	Hemiptera: Pentatomidae	Primavera do Leste/MT
Unioeste 57	<i>B. bassiana</i>	Hemiptera: Pentatomidae	Primavera do Leste/MT
IBCB 367	<i>Isaria</i> sp.	Solo de pastagens	Cuiabá/MT
IBCB 394	<i>Isaria</i> sp.	Solo de cana-de-açúcar	Espírito Sto. do Pinhal/SP
Esalq 09	<i>M. anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Pernambuco

Os isolados foram multiplicados em Meio de esporulação (M.E.) em placas de Petri, e incubados por oito dias ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase de 14 h, U.R. de  $70 \pm 10\%$ ). Após este período, os conídios foram coletados, e armazenados em frascos de vidro esterilizados, em freezer a  $-10 \pm 1^\circ\text{C}$  (ALVES; PEREIRA, 1998a; ALVES et al. 1998).

Para obtenção da cultura monospórica, os conídios foram suspensos em 10 mL de água destilada esterilizada mais Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%) e agitados em Vórtex por um minuto. Após a homogeneização, foi realizada a quantificação da suspensão ( $1,0 \times 10^2$  conídios/mL) em câmara de Neubauer. Em seguida 0,1 mL foram espalhados com alça de Drigalsky em placa de Petri contendo M.E., deixadas por oito dias em câmara climatizada ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase de 14 h, U.R. de  $70 \pm 10\%$ ). Posteriormente, uma colônia foi repicada para outra placa, obtendo-se a cultura monospórica.

### 3.3.2 Preparação das Suspensões de Fungos Entomopatogênicos

A produção e a multiplicação dos isolados foram realizadas conforme descrito na etapa 3.3.1 Assim, as suspensões de conídios foram preparadas com água destilada esterilizada, contendo Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%) e

agitadas por um minuto, quantificadas em câmara de Neubauer, seguindo-se a padronização em  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL.

### 3.3.3 Obtenção de *Anagasta kuehniella* e de *Trichogramma pretiosum*

Cartelas de  $15,0 \times 15,0$  cm contendo ovos esterilizados de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), não-parasitados e parasitados, foram obtidas do laboratório de Controle Biológico da Unioeste, *Campus* Marechal Cândido Rondon, sendo a criação desse hospedeiro baseada em Parra (1997).

### 3.3.4 Repelência Provocada pelo Fungo ao Parasitismo de *Trichogramma pretiosum*

Duas cartelas, de  $1,0 \times 5,0$  cm, contendo, aproximadamente, 200 ovos esterilizados não-parasitados de *A. kuehniella* foram pulverizadas com auxílio de um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Fanem<sup>®</sup>, de pressão constante 1,2 kgf/cm (procedimento também utilizado nos demais experimentos). Uma das cartelas foi pulverizada com 0,2 mL da suspensão do fungo ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL), enquanto a outra foi pulverizada com água deslilada esterilizada mais Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%), sendo este volume suficiente para cobrir os ovos da cartela.

Posteriormente, quando as cartelas apresentavam-se secas, as mesmas (uma com o tratamento e a outra com a testemunha) foram fixadas no interior de tubos de vidro de fundo chato esterilizados. Em cada tubo foi deixada, por 1 dia, uma fêmea com até 24 h de vida. Para cada tratamento foram realizadas 20 repetições, sendo cada tubo uma repetição. Esses tubos foram fechados com filme de PVC e mantidos em câmara climatizada a  $26 \pm 2$  °C, 14 h de fotofase e U.R. de  $70 \pm 10\%$ . Os demais experimentos deste trabalho também foram mantidos nestas mesmas condições.

Foi avaliada a porcentagem de parasitismo, realizada por *T. pretiosum*, comparando cada isolado com a respectiva testemunha, sendo o número de ovos parasitados em ambos (testemunha e tratamento) considerado como 100%,

seguindo a fórmula:  $POP_{Trat} = \frac{OPT_{Trat}}{OPT_{Trat} + OPT_{Test}} \times 100$ , onde:  $POP_{Trat}$  = porcentagem de ovos parasitados no tratamento,  $OPT_{Trat}$  = ovos parasitados no tratamento e  $OPT_{Test}$  = ovos parasitados na testemunha, sendo a porcentagem de ovos parasitados na testemunha foi obtida por diferença.

Cada isolado foi comparado com sua respectiva testemunha, sendo submetido à análise de duas amostras relacionadas através do teste não paramétrico Wilcoxon, com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0<sup>®</sup> (AYRES et al., 2003).

### 3.3.5 Efeito da Pulverização dos Fungos Antes e Após o Parasitismo

#### 3.3.5.1 Ovos pulverizados pré-parasitismo

As suspensões dos diferentes isolados ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) foram pulverizadas sobre cartelas contendo ovos esterilizados e não parasitados de *A. kuehniella* (como descrito no item 3.3.4), sendo utilizadas 20 cartelas (repetições) por isolado e 20 cartelas para a testemunha. As demais condições seguiram a metodologia descrita anteriormente.

Após o confinamento, foram avaliados o número de ovos de *A. kuehniella* enegrecidos (sinal de parasitismo), pois corresponde à fase de pré-pupa do parasitóide, quando apresenta grânulos de urato concentrados no abdome (CÔNSOLI; ROSSI; PARRA, 1999), a porcentagem de emergência, a longevidade dos adultos emergidos, a duração do período ovo-adulto e a razão sexual, segundo parâmetros biológicos descritos por Hassan (1997). A porcentagem de emergência foi calculada pela fórmula:  $Pe = \frac{Te}{To} \times 100$ , onde  $Pe$  = Porcentagem de emergência,  $Te$  = Total de emergidos,  $To$  = Total de ovos parasitados. A média da longevidade e do período ovo-adulto foi calculada através da média ponderada. A razão sexual foi

obtida pela fórmula  $R = \frac{T_{\text{f}}}{T_{\text{f}} + T_{\text{m}}}$ , onde  $R$  = razão sexual,  $T_{\text{f}}$  = total de fêmeas emergidas,  $T_{\text{m}}$  = total de machos emergidos.

### 3.3.5.2 Ovos pulverizados pós-parasitismo

Durante um dia, cartelas foram confinadas com fêmeas de *T. pretiosum* (com 24 h de vida), em tubos de vidro esterilizados, sendo utilizadas 40 cartelas. Após este período, as cartelas foram retiradas e divididas em dois grupos iguais, sendo um deles pulverizado com o isolado e o outro com a testemunha, conforme exposto anteriormente. Os parâmetros biológicos avaliados foram os mesmos descritos na etapa anterior.

Os dados da etapa anterior e desta foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo a relação entre os tratamentos (pré e pós-parasitismo) comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (duas amostras independentes) com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0<sup>®</sup> (AYRES et al., 2003).

Após a avaliação dos parâmetros biológicos, foram selecionados 10 adultos mortos por repetição, para a confirmação da mortalidade por infecção pelo isolado. A confirmação da mortalidade dos parasitóides emergidos foi realizada pelo método da câmara úmida. Para isto, os parasitóides mortos foram acondicionados em placas de petri estéreis descartáveis contendo papel filtro umedecido. Estas foram armazenadas, por quatro dias, em caixa plástica contendo espuma umedecida ao fundo, e acondicionadas em câmara climatizada a  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase. Os dados da longevidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0<sup>®</sup> (AYRES et al., 2003).

### 3.3.6 Ação dos Fungos Entomopatogênicos sobre Adultos de *Trichogramma pretiosum*

As suspensões dos isolados dos fungos entomopatogênicos foram feitas e pulverizadas nas concentrações e métodos descritos no item 3.3.5.1, sendo que as fêmeas, após 24 h, foram retiradas e deixadas em tubos de vidro sem alimento. Foi avaliada a longevidade das mesmas e, as fêmeas mortas, foram colocadas em câmara úmida para a confirmação da mortalidade por fungo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0<sup>®</sup> (AYRES et al., 2003).

### 3.3.7 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

#### 3.3.7.1 Obtenção e preparo das amostras

As suspensões dos fungos entomopatogênicos ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) foram pulverizadas, de acordo com procedimentos já descritos, sobre cartelas. Fêmeas de *T. pretiosum* com, no máximo, 24 h de emergência foram confinadas com estas cartelas por 1 dia, sendo mantidas nas condições descritas no item 3.3.1.5.2. O mesmo procedimento foi realizado na testemunha. Após esse período, os parasitóides foram processados para observação em MEV.

#### 3.3.7.2 Processamento das amostras e análises

As amostras foram fixadas por 4 h em solução composta por Paraformaldeído 2%, Glutaraldeído 2% e Tampão Fostato ( $\text{PO}_4$  0,1 M). Em seguida, foram lavadas em tampão fosfato (3  $\times$  15 minutos), sendo fixadas em solução de Tetróxido de Ósmio 1% ( $\text{OsO}_4$ ) por 2 h e realizada uma segunda lavagem em Tampão Fosfato (3  $\times$  15 minutos). Após esse procedimento, foi realizada a

desidratação das amostras (álcool 70%: 3 × 15 minutos, álcool 80%: 3 × 15 minutos, álcool 90%: 4 × 10 minutos e álcool 100%: 4 × 10 minutos), sendo encaminhadas para a desidratação final com CO<sub>2</sub> em Ponto Crítico.

As amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) contendo cola de prata, sendo esse procedimento realizado em Microscópio Estereoscópio Zeiss® com auxílio de um pêlo de pincel aderido a um clipe. Os *stubs* contendo as amostras foram recobertos com ouro, através do processo de *Sputtering* em metalizador BAL-TEC modelo SCD – 050 e observadas em alto vácuo e intensidade de feixe de elétrons de 20KV em Microscópio Eletrônico de Varredura, sendo as imagens registradas através de fotomicrografias digitais.

As amostras provenientes do material pulverizado com isolados de fungos entomopatogênicos foram comparadas ao material testemunha, sendo analisada a presença/ ausência de conídios sobre o corpo do parasitóide e o local onde estes conídios se encontravam.

### 3.3.8 Análise Histológica de *Trichogramma pretiosum*

#### 3.3.8.1 Obtenção e preparo das amostras

A obtenção e o preparo das amostras seguiram a metodologia descrita no item 3.3.2.1. Para o processamento foram selecionadas as fêmeas que parasitaram os ovos pulverizados com os isolados. Essas foram fixadas em Bouin (formaldeído 5% 5 mL + ácido acético glacial 5% 25 mL + solução saturada de ácido pícrico 5% aquoso 75 mL) por 2 h, lavadas em álcool 70% (3 × 15 minutos) e armazenadas em álcool 70% até o processamento.

#### 3.3.8.2 Processamento histológico e análise das amostras

Os procedimentos para preparos histológicos foram realizados no Laboratório de Histotécnica, e os cortes foram realizados no Laboratório de

Microtécnica, ambos da Unioeste – *Campus Cascavel*. As amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas por imersão em álcool de diferentes concentrações (álcool 80%: 10 minutos, álcool 90%: 10 minutos, álcool 95%: 10 minutos, álcool 98%: 10 minutos e álcool 100%: 2 × 15 minutos), sendo posteriormente diafanizadas por imersão em Xilol (Xilol I: 20 minutos, Xilol II: 20 minutos, Xilol III: 10 minutos e Xilol-parafina: 30 minutos). Após a completa desidratação realizou-se a parafinização (Parafina I: 180 minutos e Parafina II: 15 minutos) e o emblocamento em Parafina Histológica (Parafina Histológica/Cera de abelha 4:1).

O material emblocado foi cortado em Micrótomo, em cortes de 2 µm de espessura. Estes foram montados em lâmina de vidro para microscopia (3,0 × 10,0 cm) contendo albumina, sendo assentados sobre chapa quente para distensão dos cortes. Na sequência, foram eliminados os resíduos de albumina e as lâminas permaneceram sete dias em estufa a 35 °C, para secarem completamente.

Os cortes foram corados pelo método H/E (Hematoxilina/Eosina), para isto foi realizada a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos, álcool 100% I: 2 minutos, álcool 100% II: 2 minutos) e a reidratação destes (álcool 90%: 2 minutos, álcool 80%: 2 minutos, lavagem em água destilada corrente: 2 minutos). Para a coloração, os cortes foram banhados em Hematoxilina (30 segundos), lavados em água corrente (10 minutos), banhados em Eosina (5 segundos) e novamente lavados em água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em estufa a 35 °C por dois dias, para que os corantes secassem, quando foram recobertos por lamínulas de vidro para microscopia (2,3 cm × 3,6 cm) e fixados com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio de Luz, sendo fotografadas no Laboratório de Fotomicroscopia da Unioeste – *Campus Cascavel*, onde as imagens estão armazenadas. Foram comparados os tecidos dos parasitóides infectados pelos isolados com os tecidos dos parasitóides não infectados, além de serem analisados os locais que apresentavam crescimento do fungo.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Seletividade de Fungos Entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum*

##### 3.4.1.1 *Repelência provocada pelo fungo ao parasitismo de Trichogramma pretiosum*

Observou-se preferência das fêmeas em parasitar ovos de *A. kuehniella* da testemunha, pulverizados com água destilada estéril + Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%), com exceção do isolado IBCB 394 de *Isaria* sp. que não diferiu estatisticamente da testemunha (Tabela).

**Tabela 3.2** – Porcentagem ( $\pm$ EP) de ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados por *Trichogramma pretiosum* com chance de escolha entre ovos pulverizados com fungos entomopatogênicos ou testemunha (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

Tratamento	Ovos parasitados <sup>1</sup>	Tratamento	Ovos parasitados <sup>1</sup>
Testemunha	64,7 $\pm$ 6,95 a	Testemunha	72,4 $\pm$ 7,31 a
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	35,3 $\pm$ 6,95 b	<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	27,6 $\pm$ 7,31 b
<i>p</i>	0,0469	<i>p</i>	0,0064
Testemunha	77,0 $\pm$ 4,42 a	Testemunha	70,1 $\pm$ 6,75 a
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	23,0 $\pm$ 4,42 b	<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	29,9 $\pm$ 6,75 b
<i>p</i>	0,0001	<i>p</i>	0,0116
Testemunha	46,9 $\pm$ 10,37 a	Testemunha	80,8 $\pm$ 5,14 a
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	53,1 $\pm$ 10,37 a	<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	19,2 $\pm$ 5,14 b
<i>p</i>	0,7699	<i>p</i>	0,0001

<sup>1</sup> O número total de ovos parasitados pela fêmea confinada foi considerado 100%, sendo então calculada a proporção em cada cartela (Tratamento x Testemunha).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

Verificou-se que a repelência não está relacionada ao gênero do fungo, mas ao isolado, conforme observado na Tabela 3.2, em que dois isolados da mesma espécie (*Isaria* sp. IBCB 367 e IBCB 394) provocaram diferenças no parasitismo de *T. pretiosum*. Em testes em que *T. pretiosum* teve chance de escolha para parasitar ovos de *A. kuehniella* pulverizados e não pulverizados com extratos de meliáceas, Gonçalves-Gervásio; Vendramim (2004) observaram diferenças no número de ovos parasitados, sendo que o extrato de nim (*Azadirachta indica* Juss, Meliaceae) provocou repelência, reduzindo o número de ovos parasitados.

Fêmeas de *T. pretiosum* têm a capacidade de identificar substâncias tóxicas, inapropriadas ou repelentes sobre ovos do hospedeiro, por meio do movimento de reconhecimento do ovo, que é realizado pelo caminhar para frente e para trás e pelo tateamento realizado com as antenas, as quais apresentam sensilos gustativos que detectam essas substâncias (VINSON, 1997). Desse modo, podem ocorrer situações em que o parasitóide é capaz de reconhecer o hospedeiro infectado pelo fungo, fazendo com que *T. pretiosum* passe a não parasitar esses ovos e a preferir ovos pulverizados com a solução testemunha, como verificado no presente trabalho.

#### 3.4.1.2 Efeito da pulverização dos fungos antes e após o parasitismo

Não houve diferença significativa no número de ovos de *A. kuehniella* parasitados tratados com os fungos em relação à testemunha. Também, não houve diferença quando esses foram pulverizados previa ou posteriormente ao parasitismo. Mesmo com a redução de 20% na capacidade de parasitismo de *T. pretiosum* em ovos tratados com os isolados Unioeste 43 e Esalq 09, verificou-se que a fêmea parasitou o ovo independente da substância na superfície, como tentativa de garantir a progênie (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3** – Número de ovos ( $\pm$  EP) de *Anagasta kuehniella*, pulverizados com fungos entomopatogênicos previamente ou posteriormente ao parasitismo por *Trichogramma pretiosum* (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

Número de ovos parasitados por <i>T. pretiosum</i>					
Tratamentos	Pós-parasitismo	Pré-parasitismo	<i>p</i>	<sup>1</sup> RP(%)	Classes
Testemunha	33,53 $\pm$ 2,57 A	38,05 $\pm$ 5,07 Aa	0,9030	---	---
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	33,55 $\pm$ 1,67 A	41,30 $\pm$ 3,98 Aa	0,1762	0,00	1
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	31,55 $\pm$ 1,82 A	40,85 $\pm$ 3,80 Aa	0,1595	0,00	1
<i>P</i>	0,2513	0,3955	<i>p</i>		
Testemunha	33,05 $\pm$ 2,73 A	39,16 $\pm$ 3,55 Aa	0,7653	---	---
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	34,95 $\pm$ 1,69 A	31,63 $\pm$ 3,67 Aa	0,4481	19,23	1
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	33,95 $\pm$ 1,67 A	31,89 $\pm$ 2,49 Aa	0,2610	18,56	1
<i>P</i>	0,2109	0,1765	<i>p</i>		
Testemunha	33,00 $\pm$ 2,47 A	32,65 $\pm$ 3,15 Aa	0,4613	---	---
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	33,22 $\pm$ 1,48 A	35,00 $\pm$ 4,82 Aa	0,7589	0,00	1
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	30,00 $\pm$ 1,82 A	34,50 $\pm$ 4,12 Aa	0,0329	0,00	1
<i>P</i>	0,3108	0,2109			

<sup>1</sup>RP = Redução na capacidade de parasitismo comparado com a testemunha; Classes da IOBC/WPRS para teste de toxicidade inicial sobre adultos: 1 = inócuo (<30%), 2 = levemente nocivo (30-79%), 3 = moderadamente nocivo (80-99%), 4 = nocivo (>99%).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Ressalta-se que, de acordo com a IOBC/WPRS, se um produto provoca menos de 30% de redução na capacidade de parasitismo de *T. pretiosum*, este é classificado como inócuo a este parasitóide (HASSAN, 1997), tal como os isolados aqui avaliados (Tabela 3.3). Em testes realizados com fungos entomopatogênicos Broglio-Micheletti; Santos; Pereira-Barros (2006) observaram diminuição no parasitismo de *T. galloi* em ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) tratados com um isolado de *M. anisopliae*, chegando a

reduzir em 78,3%, evidenciando que o contato direto pode afetar o controle de pragas.

Ovos de *Spodoptera frugiperda* S. (Lepidoptera: Noctuidae), tratados e não tratados com *Lecanicillium lecanii* (Vertirril) foram oferecidos a *T. atopovirilia*, e não houve alteração no parasitismo (Dalvi et al., 2007). Assim como verificado no presente trabalho, ovos de *A. kuehniella* pulverizados com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, quando oferecidos à *T. pretiosum*, não alteram o número de ovos parasitados (POTRICH et al., 2009). Apesar de *T. pretiosum* ter a capacidade de reconhecer substâncias tóxicas na superfície de ovos, quando se encontra em confinamento, faz o teste de prova no ovo, inserindo o ovipositor e verificando a condição nutricional e sendo favorável, realiza o parasitismo.

Analisando-se a seletividade de bactérias entomopatogênicas, adultos de *Trichogramma pratissolii* (Querino e Zucchi) foram tratados com *Bacillus thuringiensis* Berliner, não apresentando redução no parasitismo em ovos de *A. kuehniella* (PRATISSOLI et al., 2006).

No entanto, o extrato aquoso de sementes de nim pulverizadas sobre ovos de *A. kuehniella* reduz o parasitismo de *T. pretiosum* (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004).

Estudos da seletividade de diferentes agrotóxicos a parasitóides foram realizados por Kakakhe; Hassan (2000) que avaliaram o parasitismo e a emergência de *Trichogramma cacoeciae* Marchal, verificando que em alguns casos a redução no parasitismo chegou a 100%. Do mesmo modo, inseticidas sintéticos utilizados na produção integrada de pêssego foram classificados como moderadamente nocivos e nocivos, pois reduziram em mais de 80% o parasitismo de *T. pretiosum* em ovos de *A. kuehniella* (GIOLO et al., 2005). Resultado semelhante foi observado no número de ovos de *A. kuehniella* parasitados por *T. pretiosum* quando estes foram pulverizados com agrotóxicos utilizados na produção integrada da maçã, sendo classificados de inócuos a nocivos (MANZONI et al., 2006). Agrotóxicos utilizados na cultura da soja também foram classificados de inócuos a nocivos a *T. pretiosum* (BUENO et al., 2008). Esses autores ressaltam que os testes foram feitos em condições de laboratório, sofrendo elevada pressão, devendo ser testados a campo.

A seletividade de inseticidas reguladores do crescimento, utilizados na cultura da macieira, foi testada sobre o parasitismo de *T. pretiosum* em ovos de *A. kuehniella* utilizando a mesma metodologia testada no presente trabalho, verificando que alguns produtos atuam negativamente no parasitismo de *T. pretiosum*. Estes autores recomendam a presente metodologia como uma das alternativas à metodologia padrão sugerida pela IOBC/WPRS (MORANDI FILHO et al., 2008).

O parasitismo realizado por *T. pretiosum* em ovos, que em livre escolha houve repelência, pode acontecer por uma aceitação no momento da penetração do ovipositor no ovo, reconhecendo o valor nutricional (VINSON, 1997). Nettles et al. (1983, 1985) apud Vinson (1997) descrevem que certas substâncias químicas, apesar de serem tóxicas, podem ser atrativas quando o parasitóide faz a prova do ovo com o ovipositor, o que também pode ocorrer para os isolados de fungos que foram classificados como repelentes em livre escolha e que apresentaram número de ovos parasitados semelhante à testemunha, quando em confinamento.

A porcentagem de emergência dos adultos de *T. pretiosum* não diferiu entre os ovos pulverizados com os isolados de fungos e os ovos pulverizados com a testemunha (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4** – Porcentagem ( $\pm$  EP) de adultos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos prévia ou posteriormente ao parasitismo (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

¹ Porcentagem de adultos de <i>T. pretiosum</i> emergidos			
Tratamentos	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>P</i>
Testemunha	88,1 $\pm$ 9,71 Aa	91,2 $\pm$ 2,77 Aa	0,0579
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	82,3 $\pm$ 2,77 Ba	90,9 $\pm$ 2,62 Aa	0,0403
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	90,2 $\pm$ 5,49 Aa	91,7 $\pm$ 2,55 Aa	0,0865
<i>p</i>	0,4919	0,8981	<i>P</i>
Testemunha	86,2 $\pm$ 3,65 Aa	88,5 $\pm$ 3,46 Aa	0,9552
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	90,9 $\pm$ 2,18 Aa	86,1 $\pm$ 3,56 Aa	0,3234
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	90,7 $\pm$ 3,67 Aa	79,2 $\pm$ 3,51 Ba	0,0455
<i>p</i>	0,8560	0,0692	<i>p</i>
Testemunha	74,5 $\pm$ 6,64 Aa	82,5 $\pm$ 10,90 Aa	0,4588
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	69,6 $\pm$ 12,11 Aa	63,8 $\pm$ 6,88 Aa	0,4713
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	88,2 $\pm$ 6,59 Aa	76,0 $\pm$ 9,95 Ba	0,0123
<i>p</i>	0,3793	0,1435	

¹ Porcentagem calculada em relação ao número de ovos parasitados e total de emergidos.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Entretanto, quando o isolado Unioeste 47 (*B. bassiana*) foi aplicado previamente ao parasitismo, houve redução na emergência, sendo de 82,3% em ovos tratados previa e 90,8% de emergência em ovos tratados posteriormente ao parasitismo. O inverso ocorreu com os isolados Esalq 09 (*M. anisopliae*) e IBCB 394 (*Isaria* sp.), que interferiram na porcentagem de adultos emergidos quando estes foram aplicados posteriormente ao parasitismo (respectivamente, 79,2 e 76,0% de emergência).

Esta pequena diferença, apesar de significativa, pode ter ocorrido pela infecção dos ovos do hospedeiro, não permitindo que o parasitóide se desenvolvesse. A entrada do fungo no ovo pode acontecer pela aderência de conídios ao ovipositor ou pela germinação na superfície do ovo e penetração pelo orifício de abertura deixado pelo processo de oviposição e ainda pela ação direta do

fungo, como verificado por Almeida et al. (1982a; 1982b) em ovos de *D. saccharalis*. O fungo pode ainda ter penetrado e colonizado o ovo do hospedeiro internamente, consumindo os nutrientes presentes e necessários para o desenvolvimento das fases imaturas do parasitóide. Sabe-se que o valor nutricional do ovo do hospedeiro está diretamente relacionado ao desenvolvimento de *T. pretiosum*, principalmente das fêmeas desse parasitóide.

A interferência no desenvolvimento de *T. pretiosum* pode provocar redução na emergência deste parasitóide, como observado para *Trichogramma galloi* em ovos de *D. saccharalis*, em que *M. anisopliae* reduziu em 87,5% a emergência (BROGLIO-MICHELETTI; SANTOS; PEREIRA-BARROS, 2006) Enquanto, a emergência de *T. pretiosum* em ovos tratados com *L. lecanii* não foi reduzida (DALVI et al., 2007). No entanto, o fungo *M. anisopliae* interferiu na emergência de *T. pretiosum* quando aplicado previamente ao parasitismo, enquanto *B. bassiana* não interferiu neste parâmetro (POTRICH et al., 2009).

Testando a seletividade de alguns isolados de *B. thuringiensis* misturados ao mel, Pratisoli et al. (2006) verificaram que os mesmos interferiram, significativamente, na emergência da F1 de *T. pretiosii*.

Goncalves-Gervásio; Vendramim (2004) verificaram redução na porcentagem de *T. pretiosum* emergidos no tratamento dos ovos de *A. kuehniella* com extrato aquoso de sementes de nim.

Inseticidas usados na cultura do tomate causaram redução na emergência de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com estes após o parasitismo (MOURA et al., 2005). Lebaycid e Match, avaliados em duas técnicas, diminuíram a emergência da progênie de *T. pretiosum* (MORANDI FILHO et al., 2008). Com isto, verifica-se que há mais de uma metodologia que pode ser testada para verificar a seletividade de produtos a parasitóides. O inseticida abamectin + óleo mineral, quando aplicado previamente e posteriormente ao parasitismo, interferiu na emergência de *T. pretiosum*, 35,90% e 38,80%, respectivamente (CIOCIOLA JÚNIOR et al., 1999).

Ao contrário do observado para a emergência, a razão sexual não foi afetada pelos fungos, independente do momento da aplicação (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5** – Razão sexual ( $\pm$  EP) de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos prévia ou posteriormente ao parasitismo (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

<sup>1</sup> Razão sexual de <i>T. pretiosum</i>			
Tratamentos	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>p</i>
Testemunha	0,66 $\pm$ 0,04 Aa	0,66 $\pm$ 0,03 Aa	0,5646
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	0,64 $\pm$ 0,03 Aa	0,68 $\pm$ 0,03 Aa	0,5609
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	0,64 $\pm$ 0,02 Aa	0,61 $\pm$ 0,03 Aa	0,3369
<i>P</i>	0,7776	0,2693	<i>p</i>
Testemunha	0,60 $\pm$ 0,03 Aa	0,68 $\pm$ 0,04 Aa	0,6404
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	0,56 $\pm$ 0,05 Aa	0,64 $\pm$ 0,03 Aa	0,2926
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	0,58 $\pm$ 0,10 Aa	0,70 $\pm$ 0,02 Aa	0,1021
<i>P</i>	0,6816	0,4913	<i>p</i>
Testemunha	0,61 $\pm$ 0,07 Aa	0,74 $\pm$ 0,05 Aa	0,2319
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	0,68 $\pm$ 0,06 Aa	0,67 $\pm$ 0,04 Aa	0,2919
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	0,61 $\pm$ 0,05 Aa	0,65 $\pm$ 0,05 Aa	0,2862
<i>P</i>	0,2322	0,4388	

<sup>1</sup> Razão sexual calculada pela fórmula  $R = \frac{T_{\text{f}}}{T_{\text{f}} + T_{\text{m}}}$ , onde *R* = razão sexual, *T<sub>f</sub>* = total de fêmeas emergidas, *T<sub>m</sub>* = total de machos emergidos

Médias seguidas pela mesma letra maiuscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas pela mesma letra minuscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

A razão sexual de *T. atopovirilia* emergidos de ovos pulverizados com a solução testemunha e *L. lecanii* ficou em 0,81, não diferindo entre si, (DALVI et al., 2007). Do mesmo modo, Potrich et al. (2009) avaliaram a razão sexual de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* pulverizados com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, não observando diferença quando comparados à testemunha, tanto nas pulverizações realizadas previamente ao parasitismo quanto nas pulverizações realizadas posteriormente ao parasitismo, apresentando razões próximas as observadas no presente trabalho.

A razão sexual da F1 de *T. pratissolii* alimentados com mel + Bt analisados por Pratissoli et al. (2006) foi superior a 0,50, sendo um valor considerado satisfatório e também próximo ao observado no presente trabalho.

A aplicação dos inseticidas utilizados na cultura da maçã não interferiram na razão sexual, com exceção do Lebaycid<sup>®</sup> 500 (100) em que a razão sexual foi 0,05 (MORANDI FILHO et al., 2008).

Em relação ao período ovo-adulto, nos ovos tratados com *B. bassiana* ou *Isaria* sp. não houve efeito da aplicação dos fungos. No entanto, o mesmo não foi observado no caso de *M. anisopliae*, isolado Esalq 09, o qual provocou aumento significativo na duração desse parâmetro, tanto para fêmeas (6,92 dias) como para machos (7,15 dias), quando a pulverização ocorreu previamente ao parasitismo. Contudo, quando esse isolado foi aplicado posteriormente ao parasitismo, verificou-se uma diminuição no período ovo-adulto de fêmeas (6,33 dias) e machos (6,59 dias) (Tabela). Quando o isolado Unioeste 43 foi pulverizado posteriormente ao parasitismo reduziu o período ovo-adulto de machos, sendo estatisticamente igual a Esalq 09.

**Tabela 3.6** – Período ovo-adulto ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* criados em ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos, prévia ou posteriormente ao parasitismo, (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

Período ovo-adulto de fêmeas de <i>T. pretiosum</i>				Período ovo-adulto de macho de <i>T. pretiosum</i>		
Tratamentos	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>p</i>	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>p</i>
Testemunha	7,04 $\pm$ 0,09 Aa	6,80 $\pm$ 0,10 Aa	0,0539	7,23 $\pm$ 0,05 Aa	7,16 $\pm$ 0,08 Aa	0,4478
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	6,95 $\pm$ 0,08 Aa	6,90 $\pm$ 0,05 Aa	0,6652	7,11 $\pm$ 0,08 Aa	7,17 $\pm$ 0,07 Aa	0,4249
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	6,99 $\pm$ 0,05 Aa	6,86 $\pm$ 0,06 Aa	0,0989	7,02 $\pm$ 0,06 Aa	7,07 $\pm$ 0,08 Aa	0,5250
<i>P</i>	0,6325	0,6742	<i>p</i>	0,0647	0,5705	<i>p</i>
Testemunha	6,70 $\pm$ 0,07 Aab	6,93 $\pm$ 0,10 Aa	0,1212	6,83 $\pm$ 0,06 Ab	7,13 $\pm$ 0,09 Aa	0,0578
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	6,66 $\pm$ 0,08 Ab	6,78 $\pm$ 0,07 Aa	0,1799	6,98 $\pm$ 0,09 Aab	6,95 $\pm$ 0,08 Ab	0,9185
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	6,92 $\pm$ 0,05 Aa	6,33 $\pm$ 0,05 Bb	0,0001	7,15 $\pm$ 0,09 Aa	6,59 $\pm$ 0,07 Bb	0,0001
<i>P</i>	0,0168	0,0001	<i>p</i>	0,0193	0,0002	<i>p</i>
Testemunha	6,99 $\pm$ 0,16 Aa	6,91 $\pm$ 0,16 Aa	0,6644	7,20 $\pm$ 0,18 Aa	7,19 $\pm$ 0,23 Aa	0,8209
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	7,09 $\pm$ 0,25 Aa	6,66 $\pm$ 0,21 Aa	0,2899	7,24 $\pm$ 0,23 Aa	7,07 $\pm$ 0,21 Aa	1,0000
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	7,24 $\pm$ 0,10 Aa	6,88 $\pm$ 0,17 Aa	0,0556	7,33 $\pm$ 0,06 Aa	7,29 $\pm$ 0,17 Aa	0,5458
<i>P</i>	0,3700	0,6331		0,6361	0,9483	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Período ovo-adulto mais longo não é interessante do ponto de vista do controle a campo, já que período mais longo acarreta na demora para emergência dos adultos e, conseqüentemente, diminuição no número de progênies ao longo do tempo. No entanto, alguns isolados aceleraram, o equivalente a horas, o período ovo-adulto, como verificado para o isolado Unioeste 43 e Esalq 09, podendo estar relacionado à tentativa de sobrevivência do parasitóide, já que o fungo pode ter penetrado no ovo do hospedeiro e reduzido parte dos nutrientes. A redução dos nutrientes pode forçar o parasitóide a emergir antes do tempo ideal de desenvolvimento, quando não está ainda bem formado, e por esse motivo ficar mais suscetível a outros fatores, reduzindo sua longevidade. A redução na longevidade foi observada para estes isolados (Unioeste 43: pré parasitismo fêmea, e Esalq 09: pós parasitismo fêmea e macho), sendo ambos da espécie *M. anisopliae*.

Em experimentos realizados por Potrich et al. (2009) não foi observada diferença no período ovo-adulto de *T. pretiosum* emergidos de ovos pulverizados com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, mesmo na comparação da aplicação prévia ou posterior ao parasitismo. No entanto, segundo os autores, a variação no período foi de 8,6 e 9,2 dias, enquanto no presente trabalho variou entre 6,33 e 7,33 dias. Essa diferença, provavelmente, está relacionada à temperatura em que os experimentos foram mantidos, sendo que no primeiro registrou-se  $25 \pm 1$  °C e no segundo,  $26 \pm 2$  °C, o que pode ter acelerado o período ovo-adulto. Ressalta-se que apesar da diferença estatística, as variações observadas no período ovo-adulto não chegam a 24 h

Quanto à longevidade de fêmeas e machos de *T. pretiosum*, não houve diferença entre os parasitóides emergidos de ovos pulverizados com os isolados de *B. bassiana* (Unioeste 47 e Unioeste 57) comparando-se com a testemunha. No entanto, verificou-se maior longevidade dos adultos que emergiram de ovos pulverizados com esses isolados posteriormente ao parasitismo, quando comparados aos pulverizados previamente ao parasitismo (Tabela 3.7).

**Tabela 3.7** – Longevidade ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos, prévia ou posteriormente ao parasitismo, (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

Tratamentos	Longevidade de Fêmeas de <i>T. pretiosum</i>			Longevidade de Machos de <i>T. pretiosum</i>		
	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>p</i>	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>p</i>
Testemunha	1,51 $\pm$ 0,05 Ba	1,80 $\pm$ 0,10 Aa	0,0212	1,70 $\pm$ 0,06 Ba	2,16 $\pm$ 0,07 Aa	0,0001
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	1,47 $\pm$ 0,05 Ba	1,90 $\pm$ 0,05 Aa	0,0001	1,63 $\pm$ 0,06 Ba	2,17 $\pm$ 0,07 Aa	0,0001
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	1,59 $\pm$ 0,04 Ba	1,85 $\pm$ 0,06 Aa	0,0011	1,69 $\pm$ 0,05 Ba	2,09 $\pm$ 0,08 Aa	0,0003
<i>p</i>	0,1236	0,7265	<i>p</i>	0,7747	0,6298	<i>p</i>
Testemunha	1,23 $\pm$ 0,04 Bb	1,97 $\pm$ 0,10 Aa	0,0001	1,30 $\pm$ 0,04 Bb	2,33 $\pm$ 0,13 Aa	0,0001
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	1,25 $\pm$ 0,04 Bb	1,85 $\pm$ 0,10 Aa	0,0001	1,38 $\pm$ 0,04 Bab	2,07 $\pm$ 0,09 Aa	0,0001
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	1,38 $\pm$ 0,03 Aa	1,36 $\pm$ 0,06 Ab	0,6459	1,54 $\pm$ 0,05 Aa	1,63 $\pm$ 0,08 Ab	0,4305
<i>p</i>	0,0182	0,0001	<i>p</i>	0,0111	0,0001	<i>P</i>
Testemunha	1,53 $\pm$ 0,11 Ab	1,47 $\pm$ 0,12 Aa	0,2548	1,53 $\pm$ 0,10 Ab	1,47 $\pm$ 0,12 Aa	0,4970
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	1,87 $\pm$ 0,25 Ab	1,31 $\pm$ 0,05 Bab	0,0052	1,79 $\pm$ 0,14 Ab	1,56 $\pm$ 0,07 Ba	0,0250
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	2,23 $\pm$ 0,09 Aa	1,17 $\pm$ 0,08 Bb	0,0002	2,39 $\pm$ 0,08 Aa	1,38 $\pm$ 0,12 Ba	0,003
<i>p</i>	0,0011	0,0499		0,0005	0,5708	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

A longevidade de fêmeas e machos de *T. pretiosum* emergidos de ovos pulverizados com Esalq 09 previamente ao parasitismo foi maior (1,38 e 1,54 dias, respectivamente) quando comparados à testemunha, no entanto, quando este isolado foi pulverizado após o parasitismo, fêmeas e machos emergidos apresentaram a menor longevidade (1,36 e 1,63 dias respectivamente) (Tabela 3.7).

Do mesmo modo nos anteriores, quando os ovos foram tratados previamente ao parasitismo, com *Isaria* sp. (IBCB 394) pré-parasitismo, verificou-se aumento na longevidade de fêmeas e machos. Contudo, no tratamento aplicado após o parasitismo esse isolado provocou redução na longevidade de fêmeas (Tabela 3.7). Ainda comparando-se a aplicação pré e pós parasitismo, os isolados IBCB 367 e IBCB 394 pulverizados previamente ao parasitismo aumentaram a longevidade de fêmeas e machos emergidos.

A maior ou menor longevidade pode estar relacionada ao desenvolvimento do parasitóide no ovo do hospedeiro. Quando este apresentar maior disponibilidade de nutrientes, poderão emergir adultos mais vigorosos e, conseqüentemente, terem longevidade maior. No entanto, os parasitóides que se desenvolveram em ovos menos nutritivos, ou que os fungos interferiram nos nutrientes, podem emergir adultos menos vigorosos e morrerem antes, ou ainda terem redução na longevidade por entrarem em contato com o isolado e serem contaminados. Essa redução foi observada na longevidade de adultos de *T. galloi* emergidos de ovos de *D. saccharalis*, sendo a mesma reduzida quando os ovos foram tratados com o isolado IPA159E de *M. anisopliae*, sendo esse isolado o mesmo que interferiu no parasitismo deste parasitóide (BROGLIO-MICHELETTI; SANTOS; PEREIRA-BARROS, 2006)

A longevidade da F1 de *T. pratissolii* alimentado com mel + Bt não foi alterada por nenhum dos métodos e técnicas de preparo das soluções, verificando que o entomopatógeno não interfere na longevidade desse parasitóide (PRATISSOLI et al., 2006).

Morandi Filho et al. (2008) também utilizaram a longevidade como um parâmetro para análise da seletividade de inseticidas a *T. pretiosum*, sendo que os inseticidas que diminuíram a longevidade foram os mesmos que reduziram o parasitismo. Assim como observado para o período ovo-adulto, as diferenças entre

os tratamentos são de poucas horas, o que em um programa de controle biológico a campo torna-se pouco relevante.

Analisando a mortalidade de adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com os isolados Unioeste 47 e Unioeste 57 de *B. bassiana* e, IBCB 367 e IBCB 394 de *Isaria* sp., não se verificou diferença quando estes foram aplicados prévia ou posteriormente ao parasitismo. No entanto, para os isolados de *M. anisopliae* houve diferença na porcentagem, sendo que o isolado Unioeste 43 provocou menor mortalidade no pré-parasitismo (6,9%), enquanto que no pós-parasitismo provocou maior mortalidade (16,6%). Já para o isolado Esalq 09, a maior porcentagem de mortalidade confirmada foi no tratamento realizado previamente ao parasitismo (16,7%) e menor no pós parasitismo (6,2%) (Tabela 3.8).

Quando os isolados foram comparados entre si, *B. bassiana* Unioeste 57 apresentou a maior porcentagem de mortalidade confirmada, tanto na pulverização pré-parasitismo quanto na pós-parasitismo.

**Tabela 3.8** – Porcentagem ( $\pm$  EP) de mortalidade confirmada de adultos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos pré e pós-parasitismo, (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

Mortalidade confirmada de <i>T. pretiosum</i>			
Tratamentos	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	<i>P</i>
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	14,5 $\pm$ 2,51 Ab	13,2 $\pm$ 2,92 Ab	0,7152
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	24,5 $\pm$ 4,44 Aa	38,6 $\pm$ 6,75 Aa	0,0833
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	6,9 $\pm$ 2,59 Bc	16,6 $\pm$ 3,37 Ab	0,0163
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	16,7 $\pm$ 4,90 Ab	6,3 $\pm$ 3,26 Bc	0,0273
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	6,9 $\pm$ 3,90 Ac	14,5 $\pm$ 5,42 Ab	0,1313
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	12,7 $\pm$ 4,92 Ab	11,7 $\pm$ 6,92 Abc	0,8449
<i>p</i>	0,0001	0,0001	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t pareado ( $p < 0,05$ ).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Pode-se verificar que quando o parasitóide emerge e entra em contato com os conídios na superfície do ovo do hospedeiro ocorre contaminação, independente se a pulverização ocorrer prévia ou posteriormente ao parasitismo. Mesmo ocorrendo a infecção do parasitóide, verifica-se que a mortalidade não é alta quando comparada a mortalidade provocada em insetos praga, como observado para *Bemisia tabaci*, em que a mortalidade confirmada variou de 23 a 99%. Além disso, a concentração utilizada neste experimento é superior a concentração usualmente utilizada em campo.

Santos Júnior et al. (2006a) verificaram que a associação de fungos entomopatogênicos com *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitóide de larva-pupa de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), pulverizados após o parasitismo, levou a maiores índices de mortalidade. No entanto, quando o parasitóide foi utilizado isoladamente, sem a associação com fungos entomopatogênicos, ele apresentou seus maiores níveis de parasitismo, ou seja, os fungos utilizados no experimento interferiram no parasitismo. Um dos isolados utilizados foi Esalq 09, o mesmo utilizado no presente trabalho, sendo que neste apresentou a maior mortalidade confirmada (16,7%) quando pulverizado previamente ao parasitismo.

#### 3.4.1.3 Ação dos fungos entomopatogênicos sobre adultos de *Trichogramma pretiosum*

A longevidade das fêmeas que entraram em contato com os ovos pulverizados com isolados, não foi afetada (Tabela 3.9), o que pode estar relacionado ao fato de *T. pretiosum* ter sua fase adulta entre 1 e 3 dias quando sem alimento (POTRICH et al., 2009), conforme mantido no presente trabalho e, dessa forma, o fungo não teria tido tempo de colonizar e ser o responsável pela mortalidade. Segundo Alves (1998), o processo de germinação, penetração e colonização dos fungos pode levar quatro dias para acontecer, porém depende muito do inseto infectado e de suas condições.

**Tabela 3.9** – Longevidade ( $\pm$  EP) de fêmeas de *Trichogramma pretiosum* que parasitaram ovos de *Anagasta kuehniella* pulverizados com fungos entomopatogênicos, sem chance de escolha, (temp.  $26 \pm 2$  °C e 14 h de fotofase).

Longevidade das fêmeas de <i>T. pretiosum</i>					
Tratamento	Dias	Tratamento	Dias	Tratamento	Dias
Testemunha	2,17 $\pm$ 0,12 a	Testemunha	2,10 $\pm$ 0,10 a	Testemunha	3,20 $\pm$ 0,45 a
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	2,00 $\pm$ 0,14 a	<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	2,05 $\pm$ 0,09 a	<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	2,90 $\pm$ 0,27 a
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	2,16 $\pm$ 0,09 a	<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	2,05 $\pm$ 0,05 a	<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	2,90 $\pm$ 0,43 a
<i>p</i>	0,5673	<i>P</i>	0,8678	<i>P</i>	0,5994

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis

Mesmo os isolados não sendo os responsáveis pela mortalidade das fêmeas que entraram em contato com os ovos pulverizados com estes, pelo exposto anteriormente, eles podem ter colonizado o corpo de *T. pretiosum* somente após sua morte. Mortalidade confirmada por fungos entomopatogênicos foi verificada em adultos do parasitóide *Aphelinus asychis* Walker (Hymenoptera: Aphelinidae) tratados com isolados de *Isaria fumosorosea* foram suscetíveis ao fungo, sendo que alguns desses isolados provocaram até 100% de mortalidade confirmada (MESQUITA et al., 1999). Ao contrário, o parasitóide *O. sokolowskii* que entrou em contato com superfícies pulverizadas com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não apresentou alteração na longevidade (SANTOS JÚNIOR et al., 2006b). Dalvi et al. (2007) também não verificaram diferença estatística entre a longevidade das fêmeas de *T. atopovirilia* que entraram em contato com *L. lecanii* e das que entraram em contato com a testemunha. Deste mesmo modo, as fêmeas de *T. pretiosum* que realizaram o parasitismo e entraram em contato com ovos de *A. kuehniella* pulverizados com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não apresentaram alteração na longevidade (POTRICH et al., 2009). Assim também foi observado no presente trabalho para estas espécies de fungos.

Dentre as fêmeas que realizaram o parasitismo e entraram em contato com os isolados, *B. bassiana* Unioeste 47 provocou mortalidade confirmada em 10% das fêmeas e Unioeste 57 em 20%. Para os isolados de *M. anisopliae*, verificou-se confirmação de mortalidade de 10% para o isolado Esalq 09 e 30% para o isolado Unioeste 43. Os isolados de *Isaria* sp. provocaram 20% de mortalidade confirmada para o isolado IBCB 394 e 55% para o isolado IBCB 367.

Mortalidade confirmada por fungos também foi observada para *B. bassiana* e *M. anisopliae* em adultos do parasitóide *O. sokolowskii* (21,0% e 9,0%, respectivamente), no entanto, não foi verificada alteração na longevidade destes, como verificado no presente trabalho para o parasitóide *T. pretiosum* (SANTOS JÚNIOR et al.; 2006b).

*B. bassiana* e *M. anisopliae* também provocaram mortalidade confirmada nas fêmeas de *T. pretiosum* que realizaram o parasitismo, em 16,7% e 6,7%, respectivamente (POTRICH et al., 2009), enquanto no presente trabalho *M. anisopliae* causou mortalidade entre 10% (Esalq 09) e 30% (Unioeste 43) e *B. bassiana* entre 10% (Unioeste 47) e 20% (Unioeste 57).

Apesar de ser observada alta mortalidade confirmada (*Isaria* sp. IBCB 394 em 55%), os isolados não interferiram na longevidade das fêmeas que realizaram o parasitismo. Além disso, também não interferiram no número de ovos parasitados. Estes itens são importantes no controle a campo, pois garantem que *T. pretiosum* não terá reduzida a sua capacidade de parasitismo e conseqüente controle da praga. Esse fator também é destacado por Bueno et al. (2009), que ressaltam ainda que o parasitismo é o que efetivamente determina a eficiência do controle a campo.

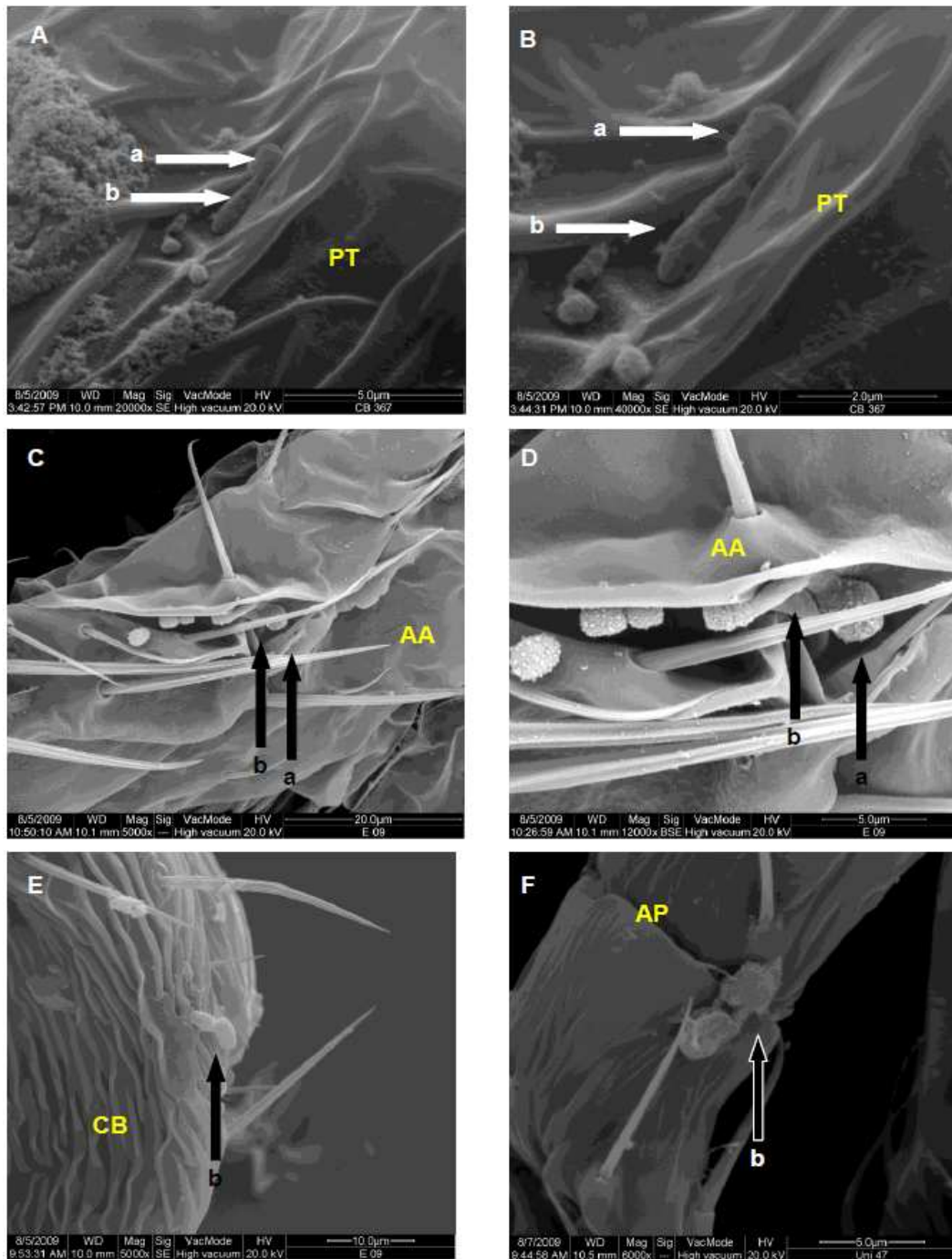
#### 3.4.2 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Com auxílio da MEV, foram observados conídios na superfície de *T. pretiosum*. Contudo, apesar desse parasitóide ter a capacidade de se limpar com o esfregar contínuo das pernas sobre as asas e sobre o corpo, em regiões de difícil acesso para que ocorra limpeza, ou mesmo após a adesão do conídio, este fixa-se e inicia a germinação. As regiões das articulações, membranas intersegmentares, dobra das asas, peças bucais e regiões ventrais, são as mais difíceis para *T. pretiosum* alcançar e, portanto, realizar a limpeza. Observa-se na Figura 3.1 que os conídios aparecem aderidos nessas áreas, o que pode ter dificultado o inseto a conseguir se limpar.

No presente trabalho observaram-se conídios, tubo de germinação e apressório de *M. anisopliae* sobre o corpo de *T. pretiosum*, como também, Lacey; Lacey; Roberts (1988) observaram em larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).

Em análises ao MEV dos processos de infecção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em cupins (*Cornitermes cumulans* Kollar, Isoptera: Termitidae), os locais mais comuns, que Neves; Alves (2004) verificaram a adesão dos conídios de *M. anisopliae*, foram nos segmentos das pernas e da cabeça, enquanto os conídios de *B. bassiana* se aderiram principalmente nas pernas, cabeça e tórax, sendo esses locais observados como uns dos mais freqüentes também no presente trabalho.

A observação de conídios aderidos ao corpo de *T. pretiosum* (Figura 3.1) confirmam a dificuldade da limpeza em certas áreas do corpo e assim, uma exposição ao entomopatôgeno, podendo provocar a infecção.

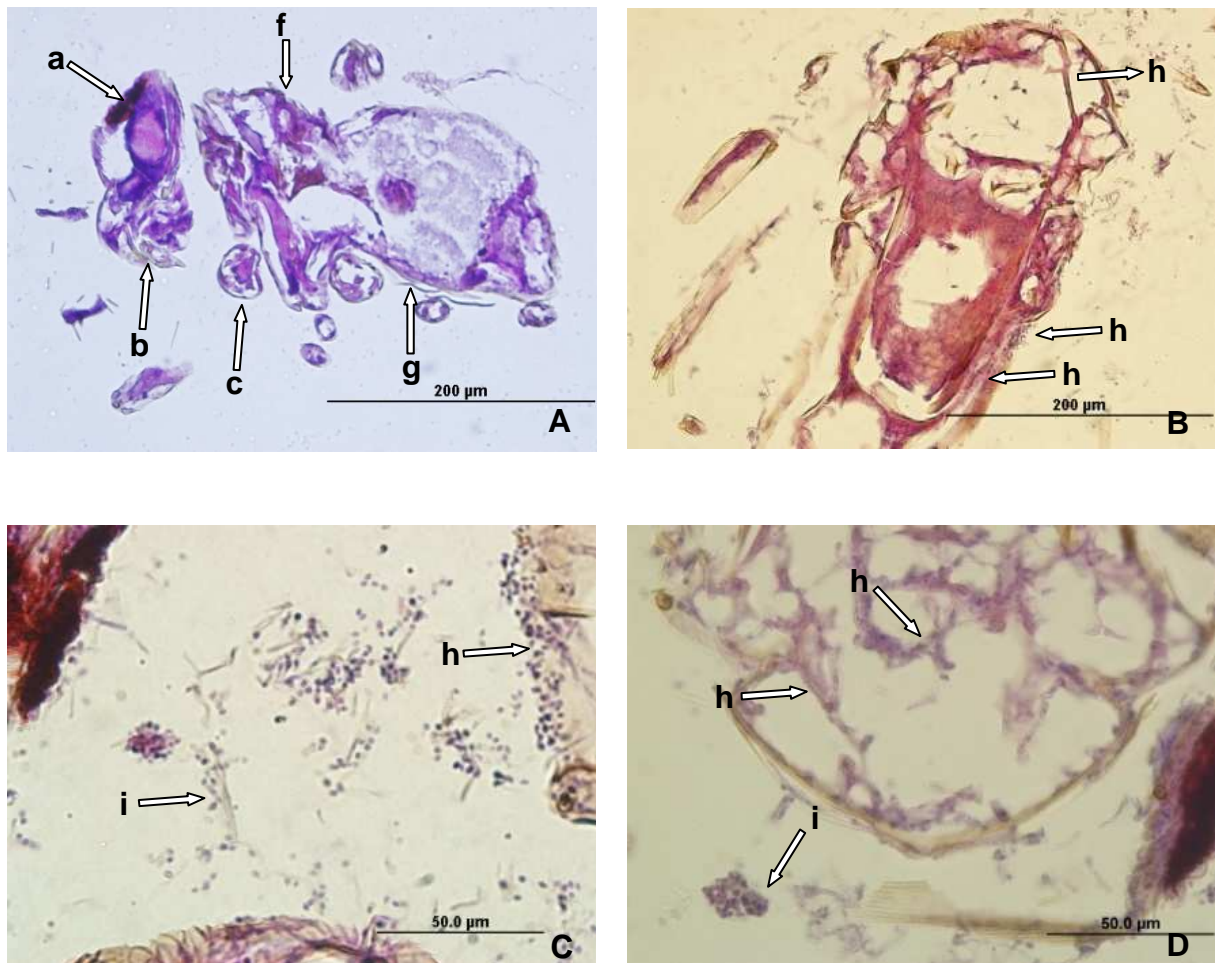


**Figura 3.1** – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Formação do tubo de germinação dos fungos entomopatogênicos sobre o corpo de *T. pretiosum*. A e B) isolado IBCB 367 de *Isaria* sp.. C, D e E) isolado Esalq 09 de *M. anisopliae* F) isolado Unioeste 47 de *B. bassiana*. a) conídio em germinação b). formação do apressório. PT: protórax ventral; AA: asa anterior; CB: cabeça; AP: articulação da perna.

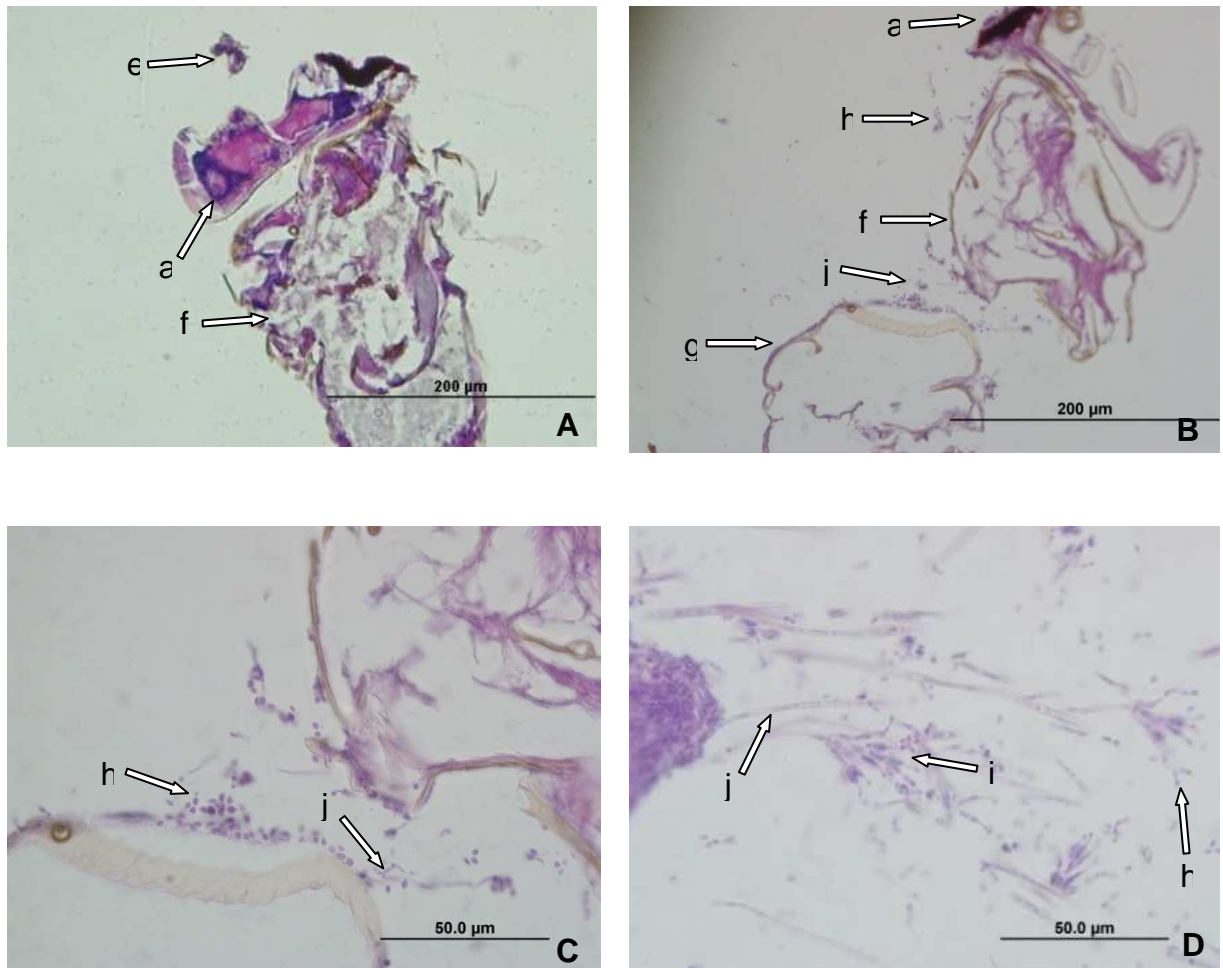
### 3.4.3 Análises Histológicas de *Trichogramma pretiosum*

Confirmando a observação da germinação, verificou-se nos tecidos a presença de hifas, conídios e fiálides (Figura 3.2 e Figura 3.3). Os tecidos em que se observou maior quantidade de hifas foram tegumento, tecido adiposo e tecido nervoso (região da cabeça), enquanto nos músculos não foram observadas essas estruturas.

O tegumento, segundo Alves; Pereira (1998b) e Alves (1998), é o primeiro tecido a ser colonizado pelos fungos entomopatogênicos, seguido da hemocele e tecido adiposo, sendo o tecido nervoso um dos últimos a ser colonizado. A ação destes sobre o sistema nervoso quase sempre se deve a ação de toxinas produzidas pelo crescimento do patógeno na hemocele do inseto, sendo que as toxinas podem ter ação rápida sobre as funções do inseto, alterando-as (ALVES, PEREIRA; 1998b). Alteração no comportamento de parasitismo de *T. pretiosum* poderia ser um exemplo atribuído a essa infecção, no entanto, no presente trabalho, não foi verificada, sendo que o número de ovos parasitados não foi alterado (Tabela 3.3), segundo Alves; Pereira (1998b) isto se deve ao fato de que para alguns insetos o efeito das toxinas é menos intenso.



**Figura 3.2** – Microscopia de Luz. A) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com ovos pulverizados com a solução testemunha. B, C e D) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com ovos pulverizados com *Isaria* sp. (IBCB 367). a) olhos b) aparelho bucal c) pernas d) asas e) antenas f) tórax g) abdome h) conídios i) fiálides.



**Figura 3.3** – Microscopia de Luz. A) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com ovos pulverizados com a solução testemunha. B, C e D) Adultos de *T. pretiosum* que entraram em contato com com ovos pulverizados com *Isaria* sp. (IBCB 394). a) olhos b) aparelho bucal c) pernas d) asas e) antenas f) tórax g) abdome h) conídios i) fiálides j) hifas.

Segundo Degrande et al. (2002), os testes iniciais com produtos em laboratório seguem uma lógica, quando inócuos não requerem outros testes, mas quando classificados como tóxicos, devem ser expostos ao teste inicial e/ou persistência em semi-campo, e caso este seja inócuo, o produto pode ser utilizado em associação com o parasitóide. Caso seja tóxico, deve ser levado aos testes em campo. Nos testes em campo, se o produto for inócuo permite a associação com o parasitóide, mas se for tóxico, não é recomendado à utilização conjunta destes. No entanto, se mesmo assim houver necessidade dessa associação, devem ser testadas estratégias de aplicação.

No presente trabalho, os isolados foram classificados, segundo IOBC/WPRS, como inócuos a *T. pretiosum*, quando avaliada a redução na capacidade de parasitismo deste. Além disso, os parâmetros porcentagem de emergência, período ovo-adulto, longevidade dos adultos emergidos e mortalidade confirmada sofreram pouca interferência dos isolados. Mesmo assim, recomenda-se que estratégias de aplicação sejam testadas, visto que os fungos entomopatogênicos são seres vivos, e não se consegue determinar precisamente o seu comportamento. As estratégias de aplicação podem ser realizadas pulverizando-se o fungo em vários tempos previamente ao parasitismo ou em diferentes tempos após o parasitismo, correspondendo às fases de desenvolvimento do parasitóide.

Nas análises de razão sexual e longevidade de fêmeas que entraram em contato com os ovos pulverizados, não foi observada interferência pela presença dos isolados, o que os mostra inócuos mais uma vez. Mesmo que a porcentagem de adultos emergidos, o período ovo-adulto e a longevidade dos emergidos tenham apresentado diferenças significativas, quando foram comparados com a testemunha, verificou-se que essa diferença, na maioria das vezes, não chegou ao índice de 10%.

Assim, verifica-se que há possibilidade de utilização conjunta desses agentes de controle, pois foram avaliados vários parâmetros biológicos de *T. pretiosum* que poderiam ser afetados, enquanto a maioria dos trabalhos é baseada apenas no parasitismo em confinamento.

### 3.5 CONCLUSÕES

Os isolados *M. anisopliae* Esalq 09, *Isaria* sp. IBCB 367 e *Isaria* sp. IBCB 394 foram os que causaram maior número de interferências no comportamento e/ou na biologia de *T. pretiosum*. Os isolados *B. bassiana* Unioeste 47, *B. bassiana* Unioeste 57 e *M. anisopliae* Unioeste 43 foram considerados seletivos, podendo ser utilizados conjuntamente com *T. pretiosum* em programas de controle de pragas. Porém, recomenda-se estudos de estratégias de aplicação, para confirmar a seletividade desses isolados e dos isolados *M. anisopliae* Esalq 09, *Isaria* sp. IBCB 367 e *Isaria* sp. IBCB 394.

### 3.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.C. et al. Determinação da patogenicidade do *M. anisopliae* (metsc.) sorok., sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (fabr.) de diferentes idades. **Revista Brasil Açucareiro**, n. 12, jul., 1982a.

ALMEIDA, L. C. et al. Efeito "in vitro" do *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok., sobre ovos da broca da cana, *Diatraea saccharalis* (fabr.). **Revista Brasil Açucareiro**. 1982b.

ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b, 1163 p.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a, 1163 p.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b, 1163 p.

ALVES, S. B. et al. Técnicas de laboratório. In: Alves, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163 p.

AYRES, M. et al. **BioEstat 3.0. aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq, 2003. 290 p.

- BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1051-1055, nov./dez., 2006.
- BUENO, A. F et al. Effects of pesticides used in soybean crops to the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1495-1503, set. 2008.
- BUENO, C. O. F. R. et al. Desempenho de Trichogrammatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 3, p. 389-394, may-jun., 2009.
- CIOCIOLA JR., A.I. et al. Impacto de inseticidas sobre a emergência de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 589-592, jul./set., 1999.
- CÔNSOLI, F. L.; ROSSI, M. M.; PARRA, J. R. P. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, 43. v. 3, n. 4, p. 271-275, 1999.
- DALVI, L. P. et al. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (Classe-Forma: Hyphomycetes) ao parasitóide *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1392-1395, set./out., 2007.
- FARIA, M.; WRAIGHT, S. P. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop-Protection**. v. 20, n. 9, p. 767-778, 2001.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.
- GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.
- GIOLO, F. P. et al. Seletividade de Agrotóxicos indicados na Produção Integrada de Pêssego a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 222-225, ago. 2005.
- GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de extratos de meliáceas sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**. n. 33, v. 5, p. 607-612, 2004.
- HAJI, F.N.P. et al. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro. In: PARRA, J.R.P. et al. **Controle biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. 609 p.

- HASSAN, S. A. Métodos padronizados para testes de seletividade, com ênfase em *Trichogramma*. In.: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324 p.
- JAZZAR, C.; HAMMAD, E. A. F. Efficacy of multiple biocontrol agents against the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. **Journal Applied Entomology**, v. 128, p. 188-194, 2004.
- KAKAKHE, S. A.; HASSAN, S. A. The side-effects of pesticide on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae), on eggs parasite. **Pakistan Journal of Biological Science**. v. 3, n. 6, p. 1011-1013, 2000.
- LACEY, C. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. R. Route of Invasion and Histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v., p. 108-118, 1988.
- LORENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. A. C.; ALVES, S. B. Ocorrência epizootica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado do Maranhão. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 183-185, 2001.
- MAGALHÃES, B. P.; MONNERAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatógenos, parasitóides e predadores. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163 p.
- MANZONI, C. G. et al. Seletividade de agrotóxicos usados na produção integrada de maçã para adultos de *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1461-1467, out. 2006.
- MESQUITA, A. L. M. et al. Predatory and Parasitic Activity of *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) following exposure to the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) under different humidity regimes. **Anais da Sociedade Entomológica Brasil**. v. 28, n. 4, p. 661-673, dez. 1999.
- MIRANDA, M. M. M. et al. Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 204-208, jan-fev, 2005.
- MORANDI FILHO, W. J. et al. Avaliação de metodologias para testes de seletividade de inseticidas reguladores de crescimento a *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) na cultura da macieira em condições de laboratório. **IDESIA**, Chile, v. 26, n. 3, set./dez., 2008.
- MOURA, A. P.; CARVALHO, G. A.; RIGITANO, R. L. O. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 203-210, mar. 2005.

- NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 1, p. 51-56, jan./fev., 2004.
- PARRA, J. R. P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In.: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324 p.
- POTRICH, M. et al. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, nov/dez., 2009
- PRATISSOLI, D. et al. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, mar./abr. 2006.
- RAMOS, E. Q. et al. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**. v. 73, p. 21-28, 2004.
- SANTOS JÚNIOR, H. J. G. et al. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre larvas da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**. n. 35, v. 2, p. 241-245, mar./abr., 2006a.
- SANTOS JÚNIOR, H.J.G. et al. Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre adultos de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae). **Maringá**, v. 28, n. 2, p. 241-245, April/June, 2006b.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B. Impacto ambiental de entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (ed.) **controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- VICENTINI, S.; FARIA, M.; OLIVEIRA, M. R. V. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with Description of a new bioassay method. **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 1, p. 97-103, 2001.
- VINSON, S. B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitóides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.(ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324 p.

#### 4 ARTIGO B – AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PULVERIZADOS EM DIFERENTES TEMPOS SOBRE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

##### 4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a ação dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Unioeste 57 e Unioeste 47), *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 e Esalq 09) e *Isaria* sp. (IBCB 367 e IBCB 394) pulverizados sobre cartelas (1,0 × 5,0 cm) contendo ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes tempos, posterior e previamente ao parasitismo por *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Pós-parasitismo (A): cartelas foram submetidas ao parasitismo por *T. pretiosum* e, posteriormente pulverizadas com os isolados ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) nos tempos de 24, 72, 144 e 168 h. Pré-parasitismo (B): as cartelas foram pulverizadas com os isolados a 0, 24, 48, 72 e 96 h e, posteriormente submetidas ao parasitismo por *T. pretiosum*. Em ambos os testes, foram avaliados: número de ovos parasitados; emergência do adulto, razão sexual; período ovo-adulto e longevidade de machos e fêmeas. Foram realizadas observações em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e em Microscopia de Luz. Em (A) nenhum isolado alterou a razão sexual, no entanto, todos interferiram no período ovo-adulto e na longevidade. Na emergência, houve interferência apenas dos isolados Unioeste 57, Unioeste 43 e IBCB 394. Em (B) não houve interferência na longevidade, no entanto, verificaram-se alterações no período ovo-adulto, no número de ovos parasitados, na porcentagem de adultos emergidos e na razão sexual, sendo neste último, apenas no tempo de 48 h. Na MEV foram observadas poucas áreas de *T. pretiosum* com conídios aderidos, enquanto nas análises histológicas de fases embrionárias de *T. pretiosum* não verificaram-se indícios de infecção por fungos entomopatogênicos.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*. *Isaria* sp. Organismo não-alvo. "Side-effect".

#### ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ACTION, SPRAYED AT DIFFERENT TIMES, ON *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

##### Abstract

The objective of this work was to verify the action of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 and Unioeste 57), *Metarhizium anisopliae*

(Unioeste 43 and Esalq 09) and *Isaria* sp. (IBCB 367 and IBCB 394) sprayed on cards (1,0 × 5,0 cm) with *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) eggs, at different times, before and after the parasitism by *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Spray post-parasitism (A): the cards were submitted to parasitism by *T. pretiosum* and later sprayed with the isolates ( $1,0 \times 10^9$  conidia/mL) at 24, 72, 144 and 168 h. In the spray pre-parasitism (B), the cards were sprayed with the isolates at 0, 24, 48, 72 and 96 h, and later subjected to parasitism by *T. pretiosum*. In both tests evaluations were made on number of parasitized eggs, adult emergence, sex ratio; egg-adult cycle and adult longevity of males and females. Observations were made in Scanning Electron Microscope (SEM) and Light Microscopy. In (A), the isolates did not affect the sex ratio, however, all of them interfered with the egg-adult cycle and longevity. Only the isolates Unioeste 57, Unioeste 43 and IBCB 394 interfered with emergency. In (B), there was no effect on longevity, however, the egg-adult, cycle, the number of parasitized eggs, the percentage of adults emerged, and the sex ratio, when sprayed at 48h, suffered interference. The SEM observations showed only few areas of *T. pretiosum* with conidia adhered. The histological analysis of *T. pretiosum* embryonic stages showed no evidence of infection by entomopathogenic fungi.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*. *Isaria* sp. Non-target organism. Side-effect.

## 4.2 INTRODUÇÃO

*Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é um microhimenóptero que parasita ovos de vários insetos (CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999), sendo considerado uma estratégia promissora para o controle da traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e da broca-pequena-do-fruto *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae), eliminando ou diminuindo consideravelmente a aplicação de agrotóxicos nessa cultura (NUNES; HOJI; VALADARES, 1999). O uso excessivo de agrotóxicos, motivado pelo desconhecimento de técnicas alternativas e de técnicas eficientes de cultivo gera grandes impactos sobre o meio ambiente, incluindo *T. pretiosum*, quando esses dois métodos de controle são usados em associação (MOREIRA et al., 2002; HEGAZI et al.; 2005, MIRANDA et al., 2005).

Com isso, uma nova frente, baseada na agricultura livre de agrotóxicos, também conhecida como agricultura orgânica, passou a utilizar métodos alternativos de controle de pragas e doenças. Dentre estes métodos,

destaca-se o uso de microrganismos entomopatogênicos, parasitóides, predadores, extratos vegetais, caldas e biofertilizantes.

Neste tipo de agricultura, em que se utiliza para controle da traça-do-tomateiro o parasitóide *T. pretiosum* (PARRA; ZUCCHI, 2004), também são utilizados fungos entomopatogênicos para controle de outro inseto praga, a mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). No entanto, tem-se a preocupação de estudar o uso associado desses agentes de controle, investigando a seletividade dos fungos entomopatogênicos (ALVES, 1998) que podem interferir no parasitismo e na biologia de *T. pretiosum*. Diante disso, alguns trabalhos foram desenvolvidos com a preocupação de avaliar a seletividade de fungos entomopatogênicos sobre parasitóides. Em testes realizados para avaliar a seletividade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok sobre *Trichogramma galloi* Zucchi, Broglio-Micheletti; Santos; Pereira-Barros (2006) verificaram que um dos isolados provocou redução no parasitismo, emergência e longevidade da segunda geração deste parasitóide. Contudo, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Viégas aplicado sobre ovos de *Spodoptera frugiperda* (S.) (Lepidoptera: Noctuidae) mostrou-se seletivo a *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner (DALVI et al., 2007).

Avaliando-se a seletividade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *M. anisopliae* sobre parâmetros biológicos de *T. pretiosum*, Polanczyk et al. (2009) verificaram que estes fungos não afetaram o desempenho deste parasitóide, considerando os seletivos. Potrich et al. (2009) sugerem a possível utilização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* associados a *T. pretiosum* em estratégias de manejo para controle de insetos. No entanto, advertem que essa estratégia pode interferir em parâmetros biológicos de *T. pretiosum*, recomendando o manejo do uso desses agentes, evitando aplicações simultâneas e espaçando-se o máximo possível a utilização destes.

Os espaçamentos entre a aplicação de um inseticida e a liberação de um inimigo natural devem ser elucidados, a fim de se obter o tempo ideal de intervalo entre os tratamentos (MOURA et al., 2006). Além da importância do espaçamento entre os tratamentos, ressalta-se a importância dos efeitos subletais, verificados, segundo Desneux; Decourtye; Delpuech (2007), através do estudo do comportamento e dos parâmetros biológicos analisados, quando o parasitóide entra

em contato com o inseticida. Segundo esses autores, os efeitos subletais devem ser considerados e estudados para que o parasitóide não seja rotulado como ineficiente.

Levando-se em conta o espaçamento entre a utilização desses agentes e os efeitos subletais descritos, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação de fungos entomopatogênicos, que apresentam potencial para serem utilizados em programas de controle biológico na cultura do tomateiro, pulverizados em diferentes tempos, prévia e posteriormente ao parasitismo por *T. pretiosum*, sobre ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae).

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

A ação dos isolados de fungos entomopatogênicos sobre *T. pretiosum*, em diferentes tempos de pulverização, foi avaliada pelos seguintes testes: a) teste da ação dos isolados de fungos entomopatogênicos em diferentes tempos de pulverização sobre ovos de *A. kuehniella* já parasitados por *Trichogramma pretiosum*, b) teste da ação de fungos entomopatogênicos, aplicados em ovos de *A. kuehniella*, em diferentes tempos, previamente ao parasitismo por *T. pretiosum*, c) observação, em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), da presença de estruturas dos fungos em *T. pretiosum* emergidos de ovos pulverizados com os isolados e d) análise histológica, em Microscopia de Luz, da presença de fungos nos tecidos de *T. pretiosum* na fase embrionária.

##### 4.3.1 Obtenção de Colônias Monospóricas dos Isolados

Os isolados de fungos entomopatogênicos das espécies *Beauveria bassiana*, *Isaria* sp. (*Paecilomyces* sp.) (Hodge et al., 2005) e *Metarhizium anisopliae* (Tabela 4.1), foram obtidos dos bancos de entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico/ Instituto Biológico (IBCB), Laboratório de Controle Microbiano/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e do Laboratório de Biotecnologia Agrícola/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste).

**Tabela 4.1** – Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios e respectiva origem

Isolados	Espécie	Hospedeiro original ou substrato	Local de origem
Unioeste 43	<i>M. anisopliae</i>	Hymenoptera: Formicidae	São Miguel do Iguaçu/PR
Unioeste 47	<i>B. bassiana</i>	Hemiptera: Pentatomidae	Primavera do Leste/MT
Unioeste 57	<i>B. bassiana</i>	Hemiptera: Pentatomidae	Primavera do Leste/MT
IBCB 367	<i>Isaria sp.</i>	Solo de pastagens	Cuiabá/MT
IBCB 394	<i>Isaria sp.</i>	Solo de cana-de-açúcar	Espírito Santo Pinhal/SP
Esalq 09	<i>M. anisopliae</i>	Mahanarva posticata	Pernambuco

Esses isolados foram obtidos por meio de cultivo monospórico, sendo as técnicas de laboratório utilizadas, e os meios de cultura para multiplicação os mesmos descritos por Alves; Pereira (1998) e Alves et al. (1998). Os isolados foram multiplicados em meio de esporulação (M.E.) em placas de Petri, durante oito dias ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase de 14 h e U.R.  $70 \pm 10\%$ ). Após isso, os conídios foram coletados e armazenados em frascos de vidro esterilizados, em freezer a  $-10 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para obtenção da cultura monospórica os conídios foram suspensos em 10 mL de água destilada esterilizada com Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%) e agitados em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, foi realizada a quantificação da suspensão ( $1,0 \times 10^2$  conídios/mL) em câmara de Neubauer. Em seguida, 0,1 mL desta suspensão foram espalhados com alça de Drigalsky em placas de Petri contendo M.E. (aproximadamente 10 conídios/placa), que foram mantidas por oito dias em câmara climatizada ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase de 14 h e U.R.  $70 \pm 10\%$ ). Após a germinação e formação de uma colônia, esta foi repicada para outra placa contendo M.E, obtendo-se a cultura monospórica.

#### 4.3.2 Preparação das Suspensões de Fungos Entomopatogênicos

A produção e a multiplicação dos isolados, bem como a preparação das suspensões foram realizadas conforme descrito na etapa 4.3.1, e as suspensões padronizadas em  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL.

#### 4.3.3 Obtenção de *Anagasta kuehniella* e *Trichogramma pretiosum*

Cartelas de  $15,0 \times 15,0$  cm contendo ovos esterilizados de *A. kuehniella*, não-parasitados e parasitados, foram obtidas do laboratório de Controle Biológico da Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, sendo a criação desse hospedeiro baseada em Parra (1997). Das cartelas com ovos parasitados foram obtidos os adultos do parasitóide.

#### 4.3.4 Fungos Entomopatogênicos Pulverizados em Diferentes Tempos sobre Ovos de *Anagasta kuehniella* já Parasitados por *Trichogramma pretiosum*

Cartelas de  $1,0 \times 5,0$  cm, contendo ovos de *A. kuehniella* esterilizados e não parasitados foram confinadas, cada uma por um dia, com uma fêmea adulta de *T. pretiosum* para o parasitismo, e após esse período a fêmea foi retirada. As cartelas foram pulverizadas com auxílio de um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Fanem<sup>®</sup> de pressão constante 1,2 kgf/cm (procedimento também utilizado nos demais testes) com o isolado na concentração de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL às 24, 72, 144 e 168 h após o parasitismo,

correspondendo às fases de ovo-larva, pré-pupa, pupa e emergência dos adultos do parasitóide (CÔNSOLI; ROSSI; PARRA, 1999). Esses tempos também foram calculados em observações prévias, considerando a temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase de 14 h e U.R. de  $70 \pm 10\%$ , sendo esta faixa de temperatura, segundo Pratissoli et al., (2004), a melhor faixa para *T. pretiosum* efetuar o parasitismo sobre ovos de *A. kuehniella*. O mesmo procedimento foi realizado para testemunha. Cada tratamento foi composto por 20 tubos de vidro de fundo chato esterilizados contendo uma cartela, sendo cada tubo uma repetição. Foram avaliados: porcentagem de emergência do parasitóide, longevidade, período ovo-adulto e razão sexual de *T. pretiosum*.

A porcentagem de emergência foi calculada pela fórmula:

$$Pe = \frac{Te}{To} \times 100, \text{ onde } Pe = \text{Porcentagem de emergência, } Te = \text{Total de emergidos, } To$$

= Total de ovos parasitados. A média da longevidade e do período ovo-adulto foi calculada através da média ponderada. A razão sexual foi obtida pela fórmula

$$R = \frac{Tf}{Tf + Tm}, \text{ onde } R = \text{razão sexual, } Tf = \text{total de fêmeas emergidas, } Tm = \text{total de machos emergidos.}$$

O total de ovos parasitados foi calculado contando-se o número de ovos de *A. kuehniella* enegrecidos (sinal de parasitismo), pois corresponde a fase de pré-pupa do parasitóide que apresenta grânulos de urato dispersos e/ou concentrados no abdome (CÔNSOLI; ROSSI; PARRA, 1999).

#### 4.3.5 Fungos Entomopatogênicos, Aplicados em Ovos de *Anagasta kuehniella*, Previamente ao Parasitismo por *Trichogramma pretiosum*

Cinco lotes, cada um contendo 20 cartelas com ovos de *A. kuehniella* esterilizados e não parasitados, foram pulverizados com a suspensão ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) de um dos isolados às 96, 72, 48, 24 e 0 h previamente ao parasitismo. Após pulverizar o último lote de cartelas (0 h) os cinco lotes foram submetidos ao parasitismo, confinando-se, por 24 h cada cartela com uma fêmea de *T. pretiosum*, com no máximo 24 h de vida. O mesmo procedimento foi realizado pulverizando-se água destilada esterilizada + Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%) (Testemunha).

Este bioensaio foi mantido nas mesmas condições do item 4.3.4. Foram avaliados o número de ovos parasitados, porcentagem de emergência, longevidade dos adultos, período ovo-adulto e razão sexual. Para este item e para o item 4.1.4, os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste de Kruskal-Wallis (estatística não paramétrica), sendo as médias comparadas pelo teste de Dunn, com auxílio do programa estatístico BioEstat 3.0<sup>®</sup> (AYRES et al., 2003).

#### 4.3.6 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

##### 4.3.6.1 Obtenção e preparo das amostras

As suspensões dos fungos entomopatogênicos (preparadas e na concentração descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.2) foram pulverizadas adotando-se os mesmos procedimentos já descritos no item 4.3.4. Adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* pulverizados com a suspensão dos fungos foram selecionados e posteriormente processados para observação ao MEV.

##### 4.3.6.2 Processamento das amostras e análises

As amostras (adultos de *T. pretiosum*) foram fixadas por quatro horas em Paraformaldeído 2%, Glutaraldeído 2% e Tampão Fostato ( $\text{PO}_4$  0,1 M). Em seguida, foram lavadas em tampão fosfato (3 × 15 minutos), sendo fixadas em Tetróxido de Ósmio 1% ( $\text{OsO}_4$ ) por 2 h e realizada uma segunda lavagem em Tampão Fosfato (3 × 15 minutos).

Após este procedimento foi realizada a desidratação das amostras (álcool 70%: 3 × 15 minutos, álcool 80%: 3 × 15 minutos, álcool 90%: 4 × 10 minutos e álcool 100%: 4 × 10 minutos), sendo encaminhadas para a desidratação final com  $\text{CO}_2$  em Ponto Crítico.

As amostras foram montadas em *stubs* contendo cola de prata, sendo este procedimento realizado em Microscópio Estereoscópio com auxílio de um pêlo de pincel aderido a um clipe. Os *stubs* foram recobertos com ouro por 3

minutos, através do processo de *Sputtering* em metalizador BAL-TEC modelo SCD – 050 e observadas em alto vácuo e intensidade de feixe de elétrons de 20KV em Microscópio Eletrônico de Varredura, sendo as imagens registradas através de Fotomicrografias digitais.

As amostras provenientes do material pulverizado com isolados de fungos entomopatogênicos foram comparadas ao material testemunha, sendo analisada a presença/ ausência de conídios sobre o corpo do parasitóide e o local onde estes conídios se encontravam.

#### 4.3.7 Processamento das Amostras e Análises Histológicas de *Trichogramma pretiosum*

##### 4.3.7.1 Obtenção e preparo das amostras

A obtenção e o preparo das amostras seguiram as metodologias descritas nos itens 4.3.2 e 4.3.4. Para o processamento foram selecionados os ovos parasitados em que a emergência do adulto de *T. pretiosum* não ocorreu. Todos estes foram fixados em solução de Bouin (formaldeído 5% 25 mL, ácido acético 5% 5 mL e solução aquosa saturada de ácido pícrico 5% 75 mL) por 2 h, lavadas em álcool 70% (3x15 minutos) e armazenadas em álcool 70% até o processamento .

##### 4.3.7.2 Processamento histológico e análise das amostras

Os procedimentos para preparos histológicos foram realizados no Laboratório de Histotécnica, e os cortes foram realizados no Laboratório de Microtécnica, ambos da Unioeste – *Campus* de Cascavel.

As amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas usando álcool em diferentes concentrações (álcool 80%: 10 minutos, álcool 90%: 10 minutos, álcool 95%: 10 minutos, álcool 98%: 10 minutos e álcool 100%: 2 x15 minutos), sendo posteriormente diafanizadas em Xilol (Xilol I: 20 minutos, Xilol II: 20

minutos, Xilol III: 10 minutos e Xilol-parafina: 30 minutos). Após a completa desidratação realizou-se a parafinização (Parafina I: 180 minutos e Parafina II: 15 minutos) e o emblocamento em Parafina Histológica (Parafina Histológica/ Cera de abelha 4:1).

O material emblocado foi cortado em micrótomo, gerando cortes de 2 µm de espessura, montados em lâmina de vidro para microscopia (3,0×10,0 cm) contendo albumina e, posteriormente, assentadas sobre chapa quente para distensão dos cortes. Na seqüência, foram eliminados os resíduos de albumina e as lâminas permaneceram 7 dias em estufa a 35 °C para secarem completamente.

Os cortes foram corados pelo método H/E (Hematoxilina/Eosina) e para isto foi realizada a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos, álcool 100% I: 2 minutos, álcool 100% II: 2 minutos) e a reidratação destes (álcool 90%: 2 minutos, álcool 80%: 2 minutos, lavagem em água destilada corrente: 2 minutos). Para a coloração, os cortes foram banhados em hematoxilina (30 segundos), lavados em água corrente (10 minutos), banhados em eosina (5 segundos) e novamente lavados em água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em estufa a 35 °C por dois dias para secagem, quando foram recobertas por lamínulas de vidro para microscopia (2,3×3,6 cm) fixadas com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio de Luz, sendo fotografados no Laboratório de Fotomicroscopia da Unioeste – *Campus* de Cascavel, onde as imagens estão armazenadas. Foram comparados os tecidos dos parasitóides imaturos provenientes de ovos pulverizados com fungos entomopatogênicos com os tecidos dos parasitóides imaturos provenientes de ovos pulverizados com a solução testemunha

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.4.1 Fungos Entomopatogênicos Pulverizados em Diferentes Tempos sobre Ovos de *Anagasta kuehniella* já Parasitados por *Trichogramma pretiosum*

Observou-se que independente do período de pulverização não houve interferência na emergência de adultos de *T. pretiosum* (Tabela ).

**Tabela 4.2** – Porcentagem ( $\pm$  EP) de adultos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella*, pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes períodos após o parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Tratamentos	Emergência de <i>T. pretiosum</i> <sup>1</sup>				<i>p</i>
	24 h Ovo-larva	72 h Pré-pupa	144 h Pupa	168 h Emergência	
Testemunha	99,2 $\pm$ 1,02 Aa	94,3 $\pm$ 3,58 Aa	84,9 $\pm$ 5,59 Aa	98,4 $\pm$ 2,71 Aa	0,1283
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	90,7 $\pm$ 7,23 Aa	87,7 $\pm$ 7,34 Aa	76,7 $\pm$ 8,38 Aa	92,1 $\pm$ 6,71 Aa	0,3570
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	72,3 $\pm$ 8,27 Ab	83,3 $\pm$ 7,96 Aa	72,6 $\pm$ 9,54 Aa	81,4 $\pm$ 6,94 Aa	0,4659
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	67,8 $\pm$ 10,6 Ab	73,3 $\pm$ 10,9 Aa	66,6 $\pm$ 7,93 Aa	85,6 $\pm$ 10,1 Aa	0,4540
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	91,2 $\pm$ 4,60 Aa	91,9 $\pm$ 5,04 Aa	87,4 $\pm$ 7,07 Aa	81,4 $\pm$ 9,93 Aa	0,9245
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	99,4 $\pm$ 2,45 Aa	79,5 $\pm$ 5,90 Aa	88,9 $\pm$ 4,66 Aa	95,5 $\pm$ 4,41 Aa	0,0943
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	91,0 $\pm$ 5,71 Aa	71,7 $\pm$ 10,20 Aa	89,5 $\pm$ 4,00 Aa	62,0 $\pm$ 10,90 Ab	0,2612
<i>p</i>	0,0045	0,2995	0,2691	0,0109	

<sup>1</sup> Porcentagem média de emergência, obtida pela fórmula:  $Pe = \frac{Te}{To} \times 100$ , onde *Pe* = Porcentagem de emergência, *Te* = Total de emergidos, *To* = Total de ovos parasitados.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferença significativa entre os isolados na emergência de *T. pretiosum* quando pulverizados nos tempos de 72 e 144 h após o parasitismo. No entanto, os isolados *B. bassiana* Unioeste 57 e *M. anisopliae* Unioeste 43, pulverizados 24 h após o parasitismo, provocaram redução na emergência de *T. pretiosum* para 72,3% e 67,8%, respectivamente, com testemunha apresentando emergência de 99,2%. Na pulverização 168 h após o parasitismo o único isolado que provocou redução na emergência foi *Isaria* sp. IBCB 394 (62,0% de emergência) enquanto a testemunha apresentou emergência de 98,4% (Tabela 4.2).

Não há relatos de estudos sobre o efeito de fungos entomopatogênicos pulverizados em diferentes tempos após o parasitismo. Porém, trabalhos foram realizados com inseticidas, que aplicados sobre ovos de *Sitotroga cerealella* Oliv. (Lepidoptera: Gelechiidae), próximos a época de emergência de *T. pretiosum*, reduziram o percentual de emergência desse parasitóide em até 34% (CÉSAR FILHO; ALMEIDA, 1997). *T. pretiosum* mostrou-se mais suscetível quando os inseticidas foram aplicados no período de ovo-larva, pois ocorre maior tempo de contato entre o inseticida e o ovo do hospedeiro, permitindo a penetração do produto através do córion, possibilitando a contaminação do embrião, pois as larvas apresentam maior movimento quando comparadas às pupas, o que as expõem ao maior contato com as substâncias que penetram no ovo. Os indivíduos na fase de pupa foram mais tolerantes, sendo atribuída a menor taxa de penetração do inseticida, pois foi aplicado um ou dois dias antes de sua emergência (CARVALHO; PARRA; BATISTA, 2001).

A fase de pré-pupa de *T. pretiosum* foi a mais suscetível aos produtos utilizados na cultura do tomate, reduzindo significativamente a emergência do parasitóide, pois na fase de ovo-larva e pupa apenas alguns produtos provocaram alterações (MOURA; CARVALHO; RIGITANO, 2005). No entanto, em ensaios realizados por Moura et al. (2006), a fase de pupa foi a mais suscetível a inseticidas, reduzindo a emergência de *T. pretiosum*. Em estudos utilizando extratos vegetais, a fase de pupa também foi a mais sensível à ação do extrato de sementes de nim, reduzindo a porcentagem de emergência de *T. pretiosum* (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004).

Ao contrário do observado em trabalhos com inseticidas, no presente trabalho não foi verificada redução na emergência de *T. pretiosum* quando

a pulverização foi realizada sobre as diferentes fases de desenvolvimento, as diferenças foram observadas apenas entre os isolados. Apesar da redução verificada no presente estudo, há grande vantagem dos fungos entomopatogênicos em relação aos inseticidas, comumente utilizados na cultura do tomate, sendo que estes, quando pulverizados na fase de ovo-larva, reduziram a emergência de *T. pretiosum* à 19,4%, na fase de pré-pupa à 2,4% e quando pulverizados na fase de pupa reduziram a emergência à 13,9% (MOURA; CARVALHO; RIGITANO, 2005).

Os efeitos subletais no desenvolvimento larval podem resultar de perturbações no desenvolvimento de tecidos neurais, devido às substâncias tóxicas presentes nos produtos químicos (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007), o que também poderia estar relacionado às substâncias tóxicas presentes nos fungos, no entanto, neste trabalho não foram observadas alterações na emergência de *T. pretiosum*, indiferente da fase de desenvolvimento em que os isolados foram pulverizados, mas foram observadas diferenças entre os isolados. Não foi verificada interferência na razão sexual dos adultos de *T. pretiosum* emergidos dos ovos pulverizados, nas diferentes fases de desenvolvimento em que a pulverização ocorreu e independente do isolado (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** – Razão sexual ( $\pm$  EP) de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella*, pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos após o parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Tratamentos	Razão sexual de <i>T. pretiosum</i> <sup>1</sup>				<i>p</i>
	24 h Ovo-larva	72 h Pré-pupa	144 h Pupa	168 h Emergência	
Testemunha	0,68 $\pm$ 0,04 Aa	0,55 $\pm$ 0,04 Aa	0,70 $\pm$ 0,04 Aa	0,63 $\pm$ 0,07 Aa	0,1750
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	0,58 $\pm$ 0,06 Aa	0,68 $\pm$ 0,05 Aa	0,60 $\pm$ 0,06 Aa	0,60 $\pm$ 0,07 Aa	0,1691
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	0,73 $\pm$ 0,06 Aa	0,62 $\pm$ 0,06 Aa	0,69 $\pm$ 0,11 Aa	0,63 $\pm$ 0,07 Aa	0,4766
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	0,72 $\pm$ 0,09 Aa	0,70 $\pm$ 0,06 Aa	0,74 $\pm$ 0,05 Aa	0,60 $\pm$ 0,05 Aa	0,3398
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	0,62 $\pm$ 0,04 Aa	0,59 $\pm$ 0,08 Aa	0,68 $\pm$ 0,04 Aa	0,68 $\pm$ 0,08 Aa	0,4076
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	0,54 $\pm$ 0,13 Aa	0,70 $\pm$ 0,06 Aa	0,82 $\pm$ 0,07 Aa	0,67 $\pm$ 0,07 Aa	0,3703
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	0,51 $\pm$ 0,12 Aa	0,67 $\pm$ 0,02 Aa	0,63 $\pm$ 0,05 Aa	0,65 $\pm$ 0,15 Aa	0,8757
<i>p</i>	0,2935	0,2289	0,0569	0,9771	

<sup>1</sup> A razão sexual foi obtida pela fórmula  $R = \frac{T_{\text{f}}}{T_{\text{f}} + T_{\text{m}}}$ , onde *R* = razão sexual, *T*<sub>f</sub> = total de fêmeas emergidas, *T*<sub>m</sub> = total de machos emergidos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

O único relato na literatura de avaliação da razão sexual de *T. pretiosum*, emergidos de ovos de hospedeiro tratados, foi em trabalhos realizados por Moura; Carvalho; Rigitano (2005), com inseticidas utilizados na cultura do tomateiro, não observando alteração neste parâmetro biológico.

A razão sexual pode ser afetada, quando a fêmea detecta, no momento da postura, uma alteração nutricional no ovo do hospedeiro ou alguma substância tóxica que possa causar repelência (VINSON, 1997), ou ainda, estar relacionado à mortalidade das fêmeas que na fase de desenvolvimento pós-embrionário são mais exigentes nutricionalmente. Contudo os ovos foram pulverizados após o parasitismo, e também, não se verificou alterações na razão sexual, portanto tais hipóteses são descartadas no presente trabalho.

O período ovo-adulto de fêmeas e machos foi alterado por todos os isolados, quando estes foram comparados à testemunha. No entanto, o único isolado que provocou alterações quando pulverizado sobre diferentes fases de desenvolvimento do parasitóide, foi *B. bassiana* Unioeste 47. No período ovo-adulto de fêmeas a pulverização realizada sobre a fase de pré-pupa (72 horas) provocou redução no período, enquanto nos machos a redução foi observada quando a pulverização ocorreu nas fases de pré-pupa, pupa e emergência (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4** – Período ovo-adulto ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella*, pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos após o parasitismo ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e 14 horas de fotofase).

Período ovo-adulto de fêmeas de <i>T. pretiosum</i>					
Tratamentos	24h Ovo-larva	72 h Pré-pupa	144 h Pupa	168 h Emergência	<i>p</i>
Testemunha	7,1 $\pm$ 0,15 Aa	6,9 $\pm$ 0,14 Aa	7,3 $\pm$ 0,17 Aa	7,4 $\pm$ 0,09 Aa	0,0629
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	7,5 $\pm$ 0,13 Aa	6,8 $\pm$ 0,12 ABa	6,6 $\pm$ 0,13 Bb	6,8 $\pm$ 0,13 ABb	0,0048
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	6,7 $\pm$ 0,24 Ab	6,9 $\pm$ 0,11 Aa	7,0 $\pm$ 0,08 Aa	6,7 $\pm$ 0,15 Ab	0,6909
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	6,7 $\pm$ 0,14 Ab	6,8 $\pm$ 0,16 Aa	6,6 $\pm$ 0,14 Ab	6,9 $\pm$ 0,13 Ab	0,6257
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	6,5 $\pm$ 0,13 Ab	6,6 $\pm$ 0,12 Aa	6,8 $\pm$ 0,08 Ab	6,7 $\pm$ 0,10 Ab	0,3115
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	7,1 $\pm$ 0,22 Aa	6,9 $\pm$ 0,06 Aa	7,1 $\pm$ 0,08 Aa	6,6 $\pm$ 0,13 Ab	0,1745
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	6,9 $\pm$ 0,09 Ab	6,7 $\pm$ 0,12 Aa	6,9 $\pm$ 0,08 Aa	7,1 $\pm$ 0,05 Aa	0,2551
<i>p</i>	0,0243	0,4824	0,0045	0,0005	
Período ovo-adulto de machos de <i>T. pretiosum</i>					
Tratamentos	24h Ovo-larva	72 h Pré-pupa	144 h Pupa	168 h Emergência	<i>p</i>
Testemunha	7,1 $\pm$ 0,11 Aa	7,1 $\pm$ 0,07 Aa	6,9 $\pm$ 0,09 Aa	7,3 $\pm$ 0,09 Aa	0,2310
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	7,4 $\pm$ 0,21 Aa	6,7 $\pm$ 0,10 Bb	6,7 $\pm$ 0,12 Ba	6,7 $\pm$ 0,08 Bb	0,0046
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	6,4 $\pm$ 0,14 Ab	6,6 $\pm$ 0,14 Ab	6,7 $\pm$ 0,15 Aa	6,6 $\pm$ 0,15 Ab	0,2886
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	6,5 $\pm$ 0,17 Ab	6,5 $\pm$ 0,16 Ab	6,2 $\pm$ 0,11 Ab	6,6 $\pm$ 0,14 Ab	0,2234
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	6,6 $\pm$ 0,14 Ab	6,6 $\pm$ 0,10 Ab	6,5 $\pm$ 0,12 Ab	6,3 $\pm$ 0,10 Ab	0,1348
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	6,8 $\pm$ 0,09 Ab	6,9 $\pm$ 0,05 Aa	7,1 $\pm$ 0,06 Aa	6,7 $\pm$ 0,02 Ab	0,1582
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	6,8 $\pm$ 0,10 Ab	6,8 $\pm$ 0,08 Aa	7,0 $\pm$ 0,01 Aa	6,7 $\pm$ 0,22 Ab	0,6595
<i>p</i>	0,0108	0,0047	0,0002	0,0431	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Alterações na qualidade do hospedeiro podem acelerar ou retardar o período ovo adulto do parasitóide (VINSON, 1997). A redução pode ser entendida como benéfica, pois um período ovo-adulto menor denota maior número de gerações em um mesmo período de tempo, provocando maior taxa de parasitismo, além de potencializar o controle no campo (BUENO et al., 2009). Contudo, período ovo-adulto menor pode fazer com que ocorra a emergência de insetos deformados, que podem apresentar menor vigor (capacidade de parasitismo) e menor longevidade. Segundo Desneux; Decourtye; Delpuech (2007), o menor vigor e malformações podem ocorrer em inimigos naturais após exposição a inseticidas.

Segundo Sosa-Gómez; Pereira; Alves (1998) seria lógico inferir que um parasitóide que se desenvolve dentro de um hospedeiro infectado por entomopatógeno fosse afetado pela disfunção metabólica deste, podendo impedir o desenvolvimento do parasitóide. No entanto, estes autores comentam que em muitos casos o parasitóide continua seu desenvolvimento normalmente, sem ser afetado pelo entomopatógeno.

Verificou-se que todos os isolados provocaram interferência na longevidade de fêmeas e machos de *T. pretiosum*. No entanto, o único isolado a induzir diferenças na longevidade, quando pulverizado sobre as fases de desenvolvimento, foi *B. bassiana* Unioeste 47. Na pulverização realizada na fase de ovo-larva (24 h) os adultos emergidos apresentaram maior longevidade (2,5 dias), provavelmente estando relacionado às demais aplicações coincidirem com a fase de pré-pupa (1,8 dias), pupa (1,7 dias) e emergência (1,9 dias), visto que estas são as fases mais próximas da emergência e permitem que o parasitóide que está emergindo entre em contato com o isolado, que ainda pode estar viável, contaminando *T. pretiosum* e reduzindo seu tempo de vida (Tabela ), o mesmo ocorreu para a longevidade dos machos.

**Tabela 4.5** – Longevidade ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella*, pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos após o parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Longevidade Fêmeas de <i>T. pretiosum</i>					
Tratamentos	24h Ovo-larva	72h Pré-pupa	144h Pupa	168h Emergência	<i>p</i>
Testemunha	2,5 $\pm$ 0,15 Aa	2,1 $\pm$ 0,14 Aa	2,3 $\pm$ 0,13 Aa	2,5 $\pm$ 0,07 Aa	0,0511
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	2,5 $\pm$ 0,07 Aa	1,8 $\pm$ 0,11 Ba	1,7 $\pm$ 0,12 Bb	1,9 $\pm$ 0,06 Ba	0,0001
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	1,7 $\pm$ 0,21 Ab	1,8 $\pm$ 0,11 Aa	1,9 $\pm$ 0,12 Aa	1,8 $\pm$ 0,14 Ab	0,9805
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	1,7 $\pm$ 0,13 Ab	1,8 $\pm$ 0,11 Aa	1,6 $\pm$ 0,13 Ab	1,8 $\pm$ 0,12 Ab	0,6038
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	1,5 $\pm$ 0,12 Ab	1,6 $\pm$ 0,12 Ab	1,7 $\pm$ 0,06 Ab	1,7 $\pm$ 0,09 Ab	0,3093
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	1,4 $\pm$ 0,17 Ab	1,1 $\pm$ 0,05 Ab	1,4 $\pm$ 0,22 Ab	1,1 $\pm$ 0,01 Ab	0,2068
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	1,2 $\pm$ 0,13 Ac	1,2 $\pm$ 0,06 Ab	1,1 $\pm$ 0,06 Ab	1,2 $\pm$ 0,11 Ab	0,7442
<i>p</i>	0,0001	0,0048	0,0006	0,0001	
Longevidade Machos de <i>T. pretiosum</i>					
Tratamentos	24h Ovo-larva	72h Pré-pupa	144h Pupa	168h Emergência	<i>p</i>
Testemunha	2,3 $\pm$ 0,11 Aa	2,0 $\pm$ 0,06 Aa	2,0 $\pm$ 0,08 Aa	2,3 $\pm$ 0,08 Aa	0,0506
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	2,5 $\pm$ 0,11 Aa	1,7 $\pm$ 0,10 Bb	1,7 $\pm$ 0,10 Ba	1,9 $\pm$ 0,08 Bb	0,0001
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	1,5 $\pm$ 0,11 Ab	1,6 $\pm$ 0,14 Ab	1,7 $\pm$ 0,13 Aa	1,6 $\pm$ 0,13 Ab	0,4863
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	1,6 $\pm$ 0,15 Ab	1,5 $\pm$ 0,14 Ab	1,2 $\pm$ 0,14 Ab	1,7 $\pm$ 0,14 Ab	0,1821
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	1,5 $\pm$ 0,15 Ab	1,7 $\pm$ 0,08 Ab	1,5 $\pm$ 0,10 Ab	1,4 $\pm$ 0,11 Ab	0,4212
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	1,1 $\pm$ 0,04 Ac	1,4 $\pm$ 0,12 Ab	1,1 $\pm$ 0,10 Ab	1,1 $\pm$ 0,06 Ac	0,0728
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	1,3 $\pm$ 0,15 Ac	1,5 $\pm$ 0,13 Ab	1,2 $\pm$ 0,06 Ab	1,3 $\pm$ 0,13 Ab	0,1901
<i>p</i>	0,0002	0,0011	0,0006	0,0001	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

No processo de emergência, o corpo de *T. pretiosum* entra em contato com a superfície do ovo do hospedeiro, que pode ainda conter conídios viáveis e contaminar o parasitóide via oral. Caso isso ocorra, a menor longevidade poderia estar associada à morte por liberação de toxinas desses fungos, sobre a digestão de *T. pretiosum*. Este fato foi observado por Lacey; Lacey; Roberts (1988) em larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) contaminadas por *M. anisopliae*. Segundo Desneux; Decourtye; Delpuech (2007) a redução na longevidade pode ser considerada um efeito subletal, sendo que em muitos casos verificou-se que esta redução esteve relacionada à diminuição no período ovo-adulto.

#### 4.4.2 Ação de Fungos Entomopatogênicos, Aplicados em Ovos de *Anagasta kuehniella*, Previamente ao Parasitismo por *Trichogramma pretiosum*

Os isolados *B. bassiana* Unioeste 57 e *Isaria* sp. IBCB 367, na superfície dos ovos, não interferiram no parasitismo de *T. pretiosum*, quando pulverizados em diferentes tempos previamente ao parasitismo (Tabela 4.6). Os ovos de *A. kuehniella* pulverizados com os isolados *M. anisopliae* Unioeste 43 e *B. bassiana* Unioeste 47 foram mais parasitados nas aplicações às 72 h (20,2 e 28,6 ovos parasitados, respectivamente) e menos (repelência) quando aplicados às 0 h (8,4 e 5,3 ovos parasitados, respectivamente). Ovos de *A. kuehniella* pulverizados com *Isaria* sp. IBCB 394 e *M. anisopliae* Esalq 09 apresentaram maior número de ovos parasitados quando pulverizados às 0 h (25,2 e 24,3 respectivamente) e o menor às 96 (6,4) e 72 h (6,2), respectivamente.

**Tabela 4.6** – Número de ovos ( $\pm$  EP) de *Anagasta kuehniella* parasitados por *Trichogramma pretiosum*, pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Número de ovos parasitados por <i>T. pretiosum</i> <sup>1</sup>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	<i>p</i>
Testemunha	8,6 $\pm$ 2,64 Aab	10,1 $\pm$ 5,03 Aab	15,2 $\pm$ 3,77 Aab	14,8 $\pm$ 3,61 Aab	16,8 $\pm$ 2,32 Aa	0,2526
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	5,3 $\pm$ 2,03 Bb	13,5 $\pm$ 3,94 ABab	19,8 $\pm$ 6,37 ABa	28,6 $\pm$ 4,10 Aa	4,5 $\pm$ 2,03 Bb	0,0002
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	11,3 $\pm$ 3,25 Aab	6,3 $\pm$ 2,84 Ab	7,7 $\pm$ 2,99 Ab	6,2 $\pm$ 2,26 Ab	7,7 $\pm$ 2,26 Ab	0,7394
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	8,4 $\pm$ 2,24 Bab	18,5 $\pm$ 3,41 ABa	17,5 $\pm$ 2,33 ABa	20,2 $\pm$ 1,48 Aa	18,4 $\pm$ 4,83 ABa	0,0054
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	24,3 $\pm$ 3,57 Aa	18,5 $\pm$ 3,41ABa	14,4 $\pm$ 3,48 ABab	6,2 $\pm$ 2,60 Bb	12,5 $\pm$ 4,80 ABab	0,0124
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	5,1 $\pm$ 1,73 Ab	12,6 $\pm$ 2,36 Aab	9,0 $\pm$ 2,34 Ab	12,4 $\pm$ 3,33 Aab	14,8 $\pm$ 4,48 Aab	0,2046
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	25,2 $\pm$ 4,96 Aa	12,9 $\pm$ 1,66 ABab	19,0 $\pm$ 4,01 ABa	18,1 $\pm$ 2,44 ABab	6,4 $\pm$ 2,10 Bb	0,0001
<i>p</i>	0,0001	0,0014	0,0138	0,0008	0,0828	

<sup>1</sup> Número médio de ovos com característica de parasitismo – ovos enegrecidos.

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Comparando-se os isolados dentro de cada tempo, verificou-se que para 0 h, *B. bassiana* Unioeste 47 e *Isaria* sp. IBCB 367 foram os que provocaram maior repelência (5,3 e 5,1 ovos parasitados, respectivamente), enquanto *M. anisopliae* Esalq 09 e *Isaria* sp. IBCB 394 não provocaram repelência, sendo 24,3 e 25,2 ovos parasitados em média (Tabela 4.6). *B. bassiana* Unioeste 57 pulverizado no tempo de 24 h foi o isolado que provocou maior repelência (6,3 ovos parasitados), sendo que o mesmo ocorreu nos tempos de 48, 72 e 96 h. Contudo, os isolados de *M. anisopliae* (Unioeste 43 e Esalq 09) pulverizados no tempo de 24 h não provocaram repelência ao parasitismo de *T. pretiosum* (18,5 ovos parasitados em ambos).

Quando a pulverização foi realizada no tempo de 48 h, o isolado *Isaria* sp. IBCB 367 provocou tanta repelência quanto o isolado *B. bassiana* Unioeste 57, respectivamente 9,0 e 7,7 ovos parasitados. Entretanto, *B. bassiana* Unioeste 47 e *M. anisopliae* Unioeste 43 foram os que provocaram menor repelência, 19,8 e 17,5 ovos parasitados, respectivamente. Os isolados *B. bassiana* Unioeste 47 e *M. anisopliae* Unioeste 43 foram os que provocaram menor repelência (28,6 e 20,2 ovos parasitados, respectivamente) às 72 h, ao contrário do isolado *B. bassiana* Unioeste 57 e do isolado *M. anisopliae* Esalq 09, ambos com 6,2 ovos parasitados. Quando a pulverização ocorreu às 96 h, os isolados Unioeste 57, Unioeste 47 e IBCB 394 provocaram as maiores repelências com 7,7, 4,5 e 6,4 ovos parasitados, respectivamente.

A repelência provocada pelos fungos entomopatogênicos ao parasitismo de *T. pretiosum* pode estar relacionada à capacidade deste parasitóide identificar substâncias tóxicas sobre a superfície dos ovos do hospedeiro, através do tateamento realizado com as antenas. Identificando as substâncias tóxicas, a fêmea pode rejeitar o ovo do hospedeiro ou pode, ainda, fazer a mensuração da qualidade nutricional através da inserção do ovipositor e, caso apresente valor nutricional adequado, o parasitóide poderá efetuar a postura. As substâncias tóxicas dos fungos entomopatogênicos poderiam estar relacionadas às toxinas presentes nas suspensões que, durante o processo de raspagem do meio de cultura, para obtenção dos conídios, teriam sido coletadas juntamente com partes do fungo, como micélio e toxinas (exotoxinas). Essa suspensão, então pulverizada sobre os ovos do

hospedeiro, passa a ter papel ainda mais importante na repelência causada ao parasitóide.

Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de verificar o comportamento de oviposição de parasitóides em ovos de hospedeiros pulverizados com inseticidas, sendo escassos os trabalhos realizados a fim de verificar o comportamento dos parasitóides em ovos do hospedeiro com presença de fungos entomopatogênicos.

Em relação à porcentagem de adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos pulverizados, comparando-se os isolados, verificou-se que o único que reduziu a emergência foi *B. bassiana* Unioeste 47, pulverizado 96 horas previamente ao parasitismo (Tabela 4.7). No entanto, comparando os tempos de pulverização, os isolados de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* interferiram na emergência de *T. pretiosum*, com exceção do tempo 0 h. Entre os isolados de *B. bassiana*, Unioeste 47 reduziu a emergência quando pulverizado no tempo de 96 h (1,9%), enquanto Unioeste 57 causou redução nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h. Para os isolados de *M. anisopliae*, Unioeste 43 reduziu a emergência quando pulverizado nos tempos de 48 e 72 h e Esalq 09 nos tempos de 24 e 48 h.

**Tabela 4.7** – Porcentagem ( $\pm$  EP) de adultos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Emergência de <i>T. pretiosum</i> <sup>1</sup>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	p
Testemunha	78,2 $\pm$ 3,42 Aa	78,9 $\pm$ 6,44 Aa	50,9 $\pm$ 2,27 Aa	46,6 $\pm$ 4,13 Aa	57,4 $\pm$ 4,12 Aa	0,1873
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	88,1 $\pm$ 4,96 Aa	71,0 $\pm$ 3,58 Aa	43,1 $\pm$ 3,31 ABa	36,9 $\pm$ 3,22 ABa	1,9 $\pm$ 0,50 Bb	0,0039
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	82,2 $\pm$ 3,27 Aa	49,9 $\pm$ 7,25 Ba	34,9 $\pm$ 2,75 Ba	47,7 $\pm$ 4,01 Ba	43,4 $\pm$ 4,50 Ba	0,0057
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	83,7 $\pm$ 5,06 Aa	71,3 $\pm$ 6,60 ABa	34,6 $\pm$ 2,33 Ba	39,5 $\pm$ 3,46 Ba	64,2 $\pm$ 2,27 ABa	0,0036
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	76,1 $\pm$ 2,01 Aa	44,7 $\pm$ 4,30 Ba	47,4 $\pm$ 2,92 Ba	63,8 $\pm$ 6,13 ABa	56,0 $\pm$ 3,67 ABa	0,0107
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	71,9 $\pm$ 3,00 Aa	51,9 $\pm$ 3,98 Aa	61,6 $\pm$ 4,30 Aa	52,9 $\pm$ 5,01 Aa	53,0 $\pm$ 6,14 Aa	0,3017
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	77,7 $\pm$ 2,55 Aa	63,3 $\pm$ 3,99 Aa	53,4 $\pm$ 3,54 Aa	51,9 $\pm$ 4,45 Aa	54,9 $\pm$ 5,81 Aa	0,6340
P	0,0883	0,3968	0,4264	0,7148	0,0461	

1 Porcentagem média de emergência, obtida pela fórmula:  $Pe = \frac{Te}{To} \times 100$ , onde  $Pe$  = Porcentagem de emergência,  $Te$  = Total de emergidos,  $To$  = Total de ovos parasitados

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Em trabalhos realizados com inseticidas por Foerster (2002), este verificou redução na emergência de *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) emergidos de ovos de *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae) tratados um e três dias previamente ao parasitismo. O percentual de emergência dos ovos parasitados indica se o hospedeiro é satisfatório para o parasitóide completar seu desenvolvimento, sendo que baixas taxas podem prejudicar o programa de controle biológico (BUENO et al., 2009). Dessa forma, poderia ser inferido que os isolados aplicados previamente teriam afetado o hospedeiro, tornando-o inapropriado ao desenvolvimento de *T. pretiosum*. Porém, outro fator a ser considerado é a idade do ovo do hospedeiro oferecido ao parasitóide que, no presente trabalho, apresentava 96 h, e que pode ser um fator importante, pois o seu armazenamento pode o tornar inadequado ao parasitismo.

No parâmetro razão sexual, os isolados *B. bassiana* Unioeste 57, *M. anisopliae* Unioeste 43, *M. anisopliae* Esalq 09 e *Isaria* sp. IBCB 394, pulverizados em diferentes tempos previamente ao parasitismo, não interferiram. Contudo, os isolados *B. bassiana* Unioeste 47 e *Isaria* sp. IBCB 367 interferiram na razão sexual quando pulverizados 48 h previamente ao parasitismo e quando comparados aos demais tratamentos (razão sexual de 0,4 para ambos) (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8** – Razão sexual ( $\pm$  EP) de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Razão Sexual de <i>T. pretiosum</i> <sup>1</sup>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	<i>p</i>
Testemunha	0,8 $\pm$ 0,17 Aa	0,7 $\pm$ 0,10 Aa	0,7 $\pm$ 0,15 Aa	0,7 $\pm$ 0,09 Aa	0,6 $\pm$ 0,05 Aa	0,5406
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	0,7 $\pm$ 0,16 Aa	0,6 $\pm$ 0,08 Aa	0,4 $\pm$ 0,14 Bb	0,5 $\pm$ 0,04 ABa	0,8 $\pm$ 0,01 Aa	0,0581
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	0,8 $\pm$ 0,19 Aa	0,6 $\pm$ 0,14 Aa	0,6 $\pm$ 0,16 Aab	0,7 $\pm$ 0,09 Aa	0,7 $\pm$ 0,02 Aa	0,3223
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	0,6 $\pm$ 0,11 Aa	0,6 $\pm$ 0,06 Aa	0,5 $\pm$ 0,09 Aab	0,6 $\pm$ 0,12 Aa	0,5 $\pm$ 0,07 Aa	0,9727
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	0,6 $\pm$ 0,02 Aa	0,6 $\pm$ 0,12 Aa	0,7 $\pm$ 0,04 Aa	0,7 $\pm$ 0,08 Aa	0,8 $\pm$ 0,08 Aa	0,3544
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	0,7 $\pm$ 0,20 Aa	0,6 $\pm$ 0,07 Aa	0,4 $\pm$ 0,09 Bb	0,6 $\pm$ 0,06 Aa	0,6 $\pm$ 0,013 Aa	0,6899
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	0,6 $\pm$ 0,03 Aa	0,7 $\pm$ 0,13 Aa	0,7 $\pm$ 0,02 Aa	0,7 $\pm$ 0,06 Aa	0,7 $\pm$ 0,16 Aa	0,6579
<i>p</i>	0,3786	0,8973	0,0463	0,3407	0,1310	

1 A razão sexual foi obtida pela fórmula  $R = \frac{TQ}{TQ + T\bar{Q}}$ , onde *R* = razão sexual, *TQ* = total de fêmeas emergidas, *T $\bar{Q}$*  = total de machos emergidos. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

A fêmea de *T. pretiosum* que efetuou o parasitismo nos ovos de *A. kuehniella* tratados com os isolados Unioeste 47 e IBCB 367, no tempo de 48 horas, pode ter analisado o valor nutricional do ovo, e por este não ter qualidade nutricional adequada, a mesma fazer a postura de parasitóides do sexo masculino, que são menos exigentes nutricionalmente (VINSON, 1997). Os ovos fertilizados de *T. pretiosum* dão origem às fêmeas, enquanto os ovos não fertilizados dão origem aos machos, sendo esse comportamento de fertilização é controlado voluntariamente pela fêmea. Assim, considerando-se que o tempo médio para a germinação do conídio, formação do apressório e a liberação de enzimas de degradação para a penetração do fungo no inseto é de, aproximadamente, 48 h (ALVES, 1998), a presença do fungo pode ser detectada pela fêmea como uma interferência no valor nutricional ou mesmo uma substância tóxica, justificando o resultado obtido com os isolados Unioeste 47 e IBCB 367.

A redução na razão sexual torna-se prejudicial em um programa de controle biológico, já que o número de machos passa a ser maior e estes não parasitam ovos da praga, ou seja, ocorre também interferência no número de emergidos da próxima geração.

Analisando o período ovo-adulto de fêmeas de *T. pretiosum* o único isolado a não provocar alteração nesse parâmetro foi *B. bassiana* Unioeste 47, enquanto que para os machos apenas o isolado *Isaria* sp. IBCB 394 reduziu o período, quando pulverizado no tempo de 0 e 48 h previamente ao parasitismo. Comparando-se os isolados, *B. bassiana* Unioeste 57, *M. anisopliae* Unioeste 43, *Isaria* IBCB 367 e *Isaria* IBCB 394 alteraram o período ovo-adulto de fêmeas em pelo menos um dos tratamentos, enquanto no período dos machos os isolados *B. bassiana* Unioeste 47, *B. bassiana* Unioeste 57, *M. anisopliae* Unioeste 43 e *Isaria* sp. IBCB 394 alteraram o período, aumentando ou reduzindo (Tabela 4.9).

**Tabela 4.9** – Período ovo-adulto ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* desenvolvidos em ovos de *Anagasta kuehniella* tratados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

Período ovo-adulto de fêmeas de <i>T. pretiosum</i>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	<i>p</i>
Testemunha	7,6 $\pm$ 0,18 Aab	7,1 $\pm$ 0,31 Aab	7,4 $\pm$ 0,32 Aab	7,9 $\pm$ 0,13 Aab	7,5 $\pm$ 0,30 Aab	0,0756
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	7,6 $\pm$ 0,49 Aab	7,4 $\pm$ 0,27 Aab	8,3 $\pm$ 0,25 Aa	7,6 $\pm$ 0,34 Aab	8,3 $\pm$ 0,33 Aa	0,2500
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	7,8 $\pm$ 0,42 ABab	6,1 $\pm$ 0,43 Bb	8,1 $\pm$ 0,03 Aab	8,5 $\pm$ 0,32 Aa	8,4 $\pm$ 0,19 Aa	0,0413
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	6,9 $\pm$ 0,63 Ab	6,7 $\pm$ 0,19 ABab	7,5 $\pm$ 0,43 Aab	7,3 $\pm$ 0,13 Ab	6,5 $\pm$ 0,29 Bab	0,0268
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	7,4 $\pm$ 0,07 Bab	7,2 $\pm$ 0,24 Bab	8,2 $\pm$ 0,07 Aab	7,5 $\pm$ 0,39 ABab	7,5 $\pm$ 0,14 ABab	0,0174
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	8,2 $\pm$ 0,40 Aa	7,7 $\pm$ 0,17 Aab	6,8 $\pm$ 0,13 ABb	8,3 $\pm$ 0,31 Aab	5,9 $\pm$ 0,44 Bb	0,0141
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	6,7 $\pm$ 0,14 Bb	8,6 $\pm$ 0,20 Aa	7,0 $\pm$ 0,08 Bab	8,0 $\pm$ 0,35 ABab	8,0 $\pm$ 0,05 ABab	0,0025
<i>p</i>	0,0283	0,0069	0,0133	0,0055	0,0007	
Período ovo-adulto de fêmeas de <i>T. pretiosum</i>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	<i>p</i>
Testemunha	7,5 $\pm$ 0,20 Aa	7,2 $\pm$ 0,11 Aab	7,8 $\pm$ 0,40 Aa	7,9 $\pm$ 0,12 Aab	7,6 $\pm$ 0,47 Aab	0,3148
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	7,4 $\pm$ 0,14 Aa	7,3 $\pm$ 0,54 Aab	7,5 $\pm$ 0,39 Aa	7,5 $\pm$ 0,33 Ab	8,0 $\pm$ 0,10 Aab	0,1004
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	7,8 $\pm$ 0,51 Aa	6,6 $\pm$ 0,24 Ab	7,8 $\pm$ 0,17 Aa	8,3 $\pm$ 0,33 Aa	8,2 $\pm$ 0,40 Aa	0,0549
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	7,1 $\pm$ 0,62 Aa	6,9 $\pm$ 0,17 Ab	6,9 $\pm$ 0,54 Aa	7,9 $\pm$ 0,30 Aab	6,3 $\pm$ 0,24 Ab	0,0573
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	7,8 $\pm$ 0,21 Aa	7,2 $\pm$ 0,26 Aab	7,3 $\pm$ 0,25 Aa	8,1 $\pm$ 0,31 Aa	7,0 $\pm$ 0,27 Aab	0,1694
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	7,7 $\pm$ 0,25 Aa	7,6 $\pm$ 0,20 Aa	7,5 $\pm$ 0,04 Aa	8,4 $\pm$ 0,20 Aa	7,3 $\pm$ 0,40 Aab	0,1210
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	6,8 $\pm$ 0,15 Ba	8,3 $\pm$ 0,13 Aa	6,7 $\pm$ 0,21 Ba	7,2 $\pm$ 0,12 ABb	8,1 $\pm$ 0,29 Aa	0,0080
<i>p</i>	0,1015	0,0255	0,0762	0,0294	0,0124	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

A pulverização dos ovos com alguns isolados promoveu um aumento no período ovo-adulto o que pode ser considerado negativo, pois reduz o número de gerações acarretando um menor parasitismo. A longevidade de fêmeas e machos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kueniella* pulverizados com os isolados em diferentes tempos previamente ao parasitismo não foi influenciada por nenhum dos isolados em nenhum dos tempos de pulverização (Tabela 4.10). A não interferência na longevidade é um fator importante a ser considerado, pois fêmeas com menor longevidade podem parasitar menor número de ovos do hospedeiro e assim resultam em menor eficiência de controle.

**Tabela 4.10** – Longevidade ( $\pm$  EP) de fêmeas e machos de *Trichogramma pretiosum* emergidos de ovos de *Anagasta kuehniella* pulverizados com fungos entomopatogênicos em diferentes tempos previamente ao parasitismo, ( $26 \pm 2$  °C e 14 horas de fotofase).

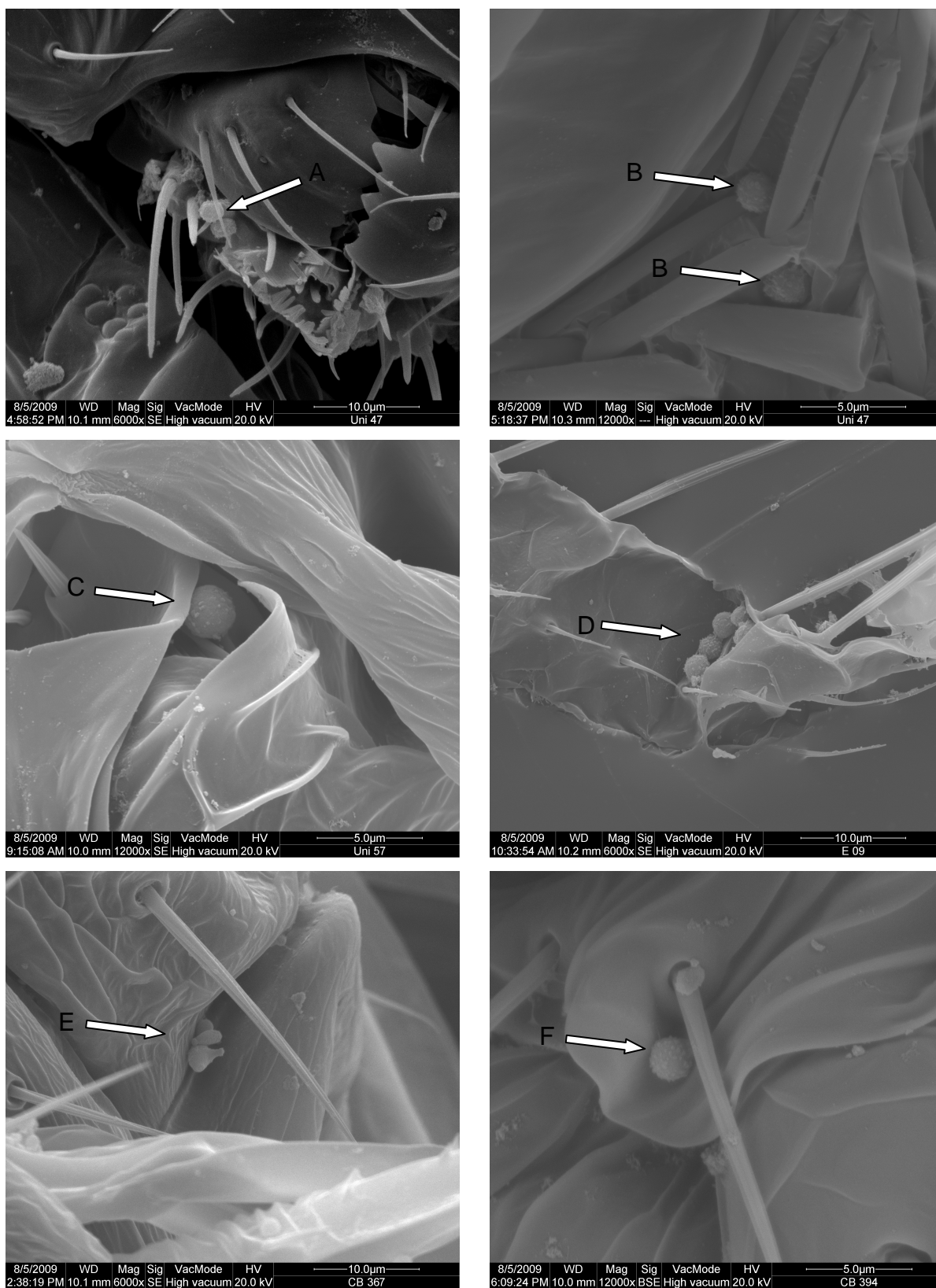
Longevidade de fêmeas de <i>T. pretiosum</i>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	<i>p</i>
Testemunha	1,06 $\pm$ 0,47 Aa	1,29 $\pm$ 0,10 Aa	1,21 $\pm$ 0,02 Aa	1,43 $\pm$ 0,08 Aa	1,55 $\pm$ 0,19 Aa	0,1023
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	1,37 $\pm$ 0,18 Aa	1,37 $\pm$ 0,10 Aa	1,00 $\pm$ 0,01 Aa	1,31 $\pm$ 0,06 Aa	1,00 $\pm$ 0,01 Aa	0,0988
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	1,43 $\pm$ 0,20 Aa	1,02 $\pm$ 0,02 Aa	1,40 $\pm$ 0,21 Aa	1,34 $\pm$ 0,24 Aa	1,35 $\pm$ 0,04 Aa	0,2499
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	1,31 $\pm$ 0,16 Aa	1,39 $\pm$ 0,07 Aa	1,28 $\pm$ 0,10 Aa	1,46 $\pm$ 0,12 Aa	1,46 $\pm$ 0,07 Aa	0,5729
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	1,58 $\pm$ 0,09 Aa	1,35 $\pm$ 0,09 Aa	1,22 $\pm$ 0,07 Aa	1,24 $\pm$ 0,08 Aa	1,58 $\pm$ 0,10 Aa	0,0521
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	1,22 $\pm$ 0,22 Aa	1,13 $\pm$ 0,13 Aa	1,30 $\pm$ 0,20 Aa	1,42 $\pm$ 0,11 Aa	1,31 $\pm$ 0,08 Aa	0,5171
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	1,47 $\pm$ 0,07 Aa	1,13 $\pm$ 0,07 Aa	1,15 $\pm$ 0,15 Aa	1,15 $\pm$ 0,05 Aa	1,17 $\pm$ 0,12 Aa	0,0586
<i>p</i>	0,3137	0,0633	0,1954	0,2609	0,0574	
Longevidade de machos de <i>T. pretiosum</i>						
Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	<i>p</i>
Testemunha	1,20 $\pm$ 0,14 Aa	1,35 $\pm$ 0,21 Aa	1,45 $\pm$ 0,12 Aa	1,55 $\pm$ 0,10 Aa	1,41 $\pm$ 0,21 Aa	0,1935
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	1,49 $\pm$ 0,08 Aa	1,35 $\pm$ 0,11 Aa	1,35 $\pm$ 0,04 Aa	1,63 $\pm$ 0,06 Aa	1,30 $\pm$ 0,02 Aa	0,0128
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	1,22 $\pm$ 0,19 Aa	1,51 $\pm$ 0,14 Aa	1,20 $\pm$ 0,01 Aa	1,39 $\pm$ 0,31 Aa	1,22 $\pm$ 0,22 Aa	0,3184
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	1,28 $\pm$ 0,12 Aa	1,58 $\pm$ 0,17 Aa	1,24 $\pm$ 0,08 Aa	1,43 $\pm$ 0,19 Aa	1,50 $\pm$ 0,09 Aa	0,3531
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	1,43 $\pm$ 0,15 Aa	1,50 $\pm$ 0,17 Aa	1,24 $\pm$ 0,19 Aa	1,19 $\pm$ 0,08 Aa	1,06 $\pm$ 0,15 Aa	0,1074
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	1,43 $\pm$ 0,21 Aa	1,26 $\pm$ 0,11 Aa	1,46 $\pm$ 0,21 Aa	1,41 $\pm$ 0,12 Aa	1,46 $\pm$ 0,18 Aa	0,5184
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	1,46 $\pm$ 0,05 Aa	1,13 $\pm$ 0,13 Aa	1,40 $\pm$ 0,08 Aa	1,18 $\pm$ 0,08 Aa	1,34 $\pm$ 0,10 Aa	0,2095
<i>p</i>	0,6565	0,2222	0,2204	0,1705	0,4072	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.3 Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Verificou-se a presença de conídios aderidos ao corpo de *T. pretiosum*, exceto nos insetos emergidos de ovos pulverizados com o isolado Unioeste 43. Observaram-se conídios, na maioria das vezes, em dobras das asas, nas membranas intersegmentais, abaixo das mandíbulas, na articulação interna entre tórax/coxa e coxa/fêmur, e nas suturas (Figura 4.1). A presença de conídios nestas áreas pode estar relacionada ao comportamento de limpeza “self-grooming” presente neste parasitóide, que, quando detecta microrganismos ou substâncias tóxicas no corpo, diminui o parasitismo usando esse tempo para fazer a limpeza, o que poderia ter ocorrido com *T. pretiosum* em contato com os isolados, onde os conídios observados se encontram em regiões difíceis de realizar a limpeza.

O comportamento de limpeza associado à diminuição na mobilidade do parasitóide reflete uma irritação dos quimiorreceptores presentes na superfície do corpo do inseto (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007). Em seu comportamento de limpeza, observado quando se manipula o parasitóide, este fica constantemente esfregando as pernas sobre a cabeça, asas e abdome, de forma que, removendo os conídios, tenha evitado a infecção. Ainda conforme os autores, o efeito irritante também pode induzir o parasitóide a caminhar para fora da área tratada, o que pode contribuir para uma menor quantidade de conídios que aderem à superfície do corpo de *T. pretiosum*.



**Figura 4.1** – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A) *B. bassiana* Unioste 47, conídios aderidos à mandíbula e B) conídios aderidos à região ventral da cabeça; C) *B. bassiana* Unioste 57 conídio aderido ao tórax ventral; D) *M. anisopliae* Esalq 09, conídios aderidos à dobra da asa; E) *Isaria* sp. IBCB

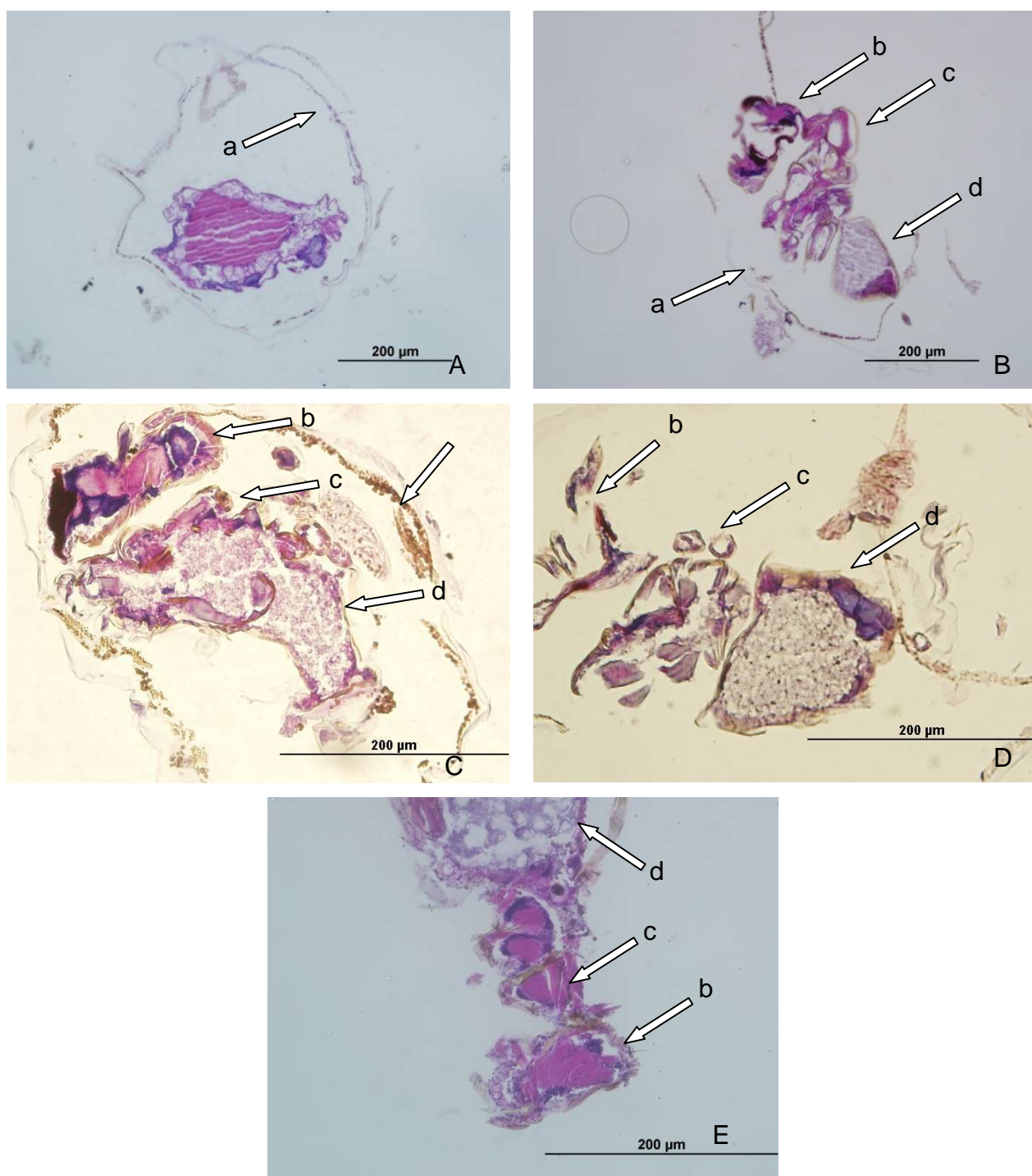
367, conídios aderidos à região intersegmentar; F) *Isaria* sp. IBCB 394 conídios aderidos à dobra da asa abaixo do sensilo tricóideo.

#### 4.4.4 Análises Histológicas de *Trichogramma pretiosum*

Observou-se na histologia das fases imaturas de *T. pretiosum*, obtidas do experimento 4.3.4, que indiferentemente do isolado e indiferente do estágio de desenvolvimento do parasitóide, não houve indícios de infecção por fungos entomopatogênicos nos diferentes tecidos analisados, o que pode significar que eles não penetram no parasitóide (Figura 4.2). Contudo, isso não pode confirmar que o entomopatógeno não tenha penetrado no ovo do hospedeiro e interferido no desenvolvimento do parasitóide, pois alterações no período ovo-adulto e na emergência foram verificadas, o que poderia ser relacionado com um déficit de nutrientes no hospedeiro, utilizado pelo entomopatógeno.

Foram verificados ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) infectados por *M. anisopliae*, que levou, em média, 3,72 dias para colonizar os ovos e matar 50% desse inseto (ALMEIDA et al., 1982a; 1982b). Desse modo, os autores inferem que os fungos têm capacidade de penetrar no ovo desse inseto, atravessando o córion, o que também poderia ocorrer em ovos de *A. kueniella*. No entanto, muitos fungos não germinam por causa da ausência de uma ou mais substâncias necessárias, que é variável de hospedeiro para hospedeiro, podendo ainda ser hospedeiro-específico (LEGER, 1993).

Com o exposto, pode-se inferir que os isolados não interferiram diretamente nos parâmetros biológicos estudados, comprovado pelas análises histológicas das fases de pré-pupa, pupa e emergência (Figura). Entretanto, se o isolado penetrou no ovo do hospedeiro e provocou alguma alteração na fase de ovo-larva (antes do ovo do hospedeiro tornar-se enegrecido), não pode ser mensurado no presente trabalho, pois nessa etapa o ovo não apresenta indícios de parasitismo e, portanto, não foi selecionado para as análises histológicas.



**Figura 4.2** – Microscopia de Luz. Análise histológica de ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados por *Trichogramma pretiosum*, mas que não apresentaram a emergência do parasitóide. Estruturas histológicas observadas e indicadas: a) córion dos ovos do hospedeiro (*A. kuehniella*). b) cabeça, c) tórax e d) abdome de *T. pretiosum* em fase embrionária. Tratamentos: A) Testemunha – fase pré-pupa. B) Testemunha – fase pupa/emergência. C) *M. anisopliae* Unioeste 43. D) *M. anisopliae* Esalq 09. E) *B. bassiana* Unioeste 47.

Apesar de não ser observada a penetração de fungos no ovo do hospedeiro, alguns inseticidas têm essa capacidade, atravessando o córion e interferindo no desenvolvimento do parasitóide (MOURA et al., 2006). Ovos de *A. kuehniella* são mais resistentes à contaminação e penetração por produtos a base de Asteraceae (plantas inseticidas), quando comparados a ovos de *S. frugiperda*, (Tavares et al., 2009). Essa característica pode ser estendida à fungos entomopatogênicos, mas para confirmar ou refutar esta hipótese trabalhos futuros, de análise histológica deste hospedeiro, devem ser desenvolvidos.

Apesar de serem observadas alterações na porcentagem de adultos emergidos, no período ovo-adulto, na longevidade e na razão sexual, quando diferentes produtos são aplicados, e dessas alterações serem importantes, as alterações observadas em muitos parâmetros biológicos apresentaram pouca variação, demonstrando que o parasitóide está protegido ou tem baixa suscetibilidade aos fungos entomopatogênicos. A proteção pode estar relacionada ao fato da fase embrionária estar protegida por dois córions, e as fases de pré-pupa e pupa, protegidas pelo córion do ovo do hospedeiro.

Porém, diferenças entre os isolados também foram observadas. Essas diferenças estão relacionadas à variabilidade genética dos isolados, as toxinas e enzimas específicas produzidas por cada um desses e a patogenicidade, sendo a germinação do fungo na superfície do ovo, e a produção de metabólitos, outros fatores a serem considerados (LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986; HAJEK; LEGER, 1994). Assim, nas estratégias em que se usam agentes de controle biológico e isolados, as pulverizações espaçadas devem ser levadas em conta, devido aos efeitos subletais que podem ocorrer. No entanto, comparando-se os efeitos observados na interação fungos entomopatogênicos e *T. pretiosum*, estes foram mínimos, podendo classificar os entomopatógenos como seletivos.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Todos os isolados de fungos entomopatogênicos provocaram interferências nos parâmetros analisados, em especial quando aplicados previamente ao parasitismo, porém, essas interferências foram mínimas quando comparadas às provocadas por inseticidas. Assim, *T. pretiosum* e fungos entomopatogênicos podem ser utilizados na mesma cultura, no entanto, deve-se considerar a aplicação dos isolados após a liberação de *T. pretiosum*, a fim de evitar a repelência provocada por esses fungos ao parasitismo.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. C. et al. Determinação da patogenicidade do *M. anisopliae* (metsc.) sorok., sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (fabr.) de diferentes idades. **Revista Brasil Açucareiro**. n. 12, jul., 1982a.

ALMEIDA, L. C. et al. Efeito “in vitro” do *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok., sobre ovos da broca da cana, *Diatraea saccharalis* (fabr.). **Revista Brasil Açucareiro**. 1982b.

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163 p.

ALVES, S. B. et al. Técnicas de laboratório. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b, 1163 p.

AYRES, M. et al. **BioEstat 3.0. aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq, 2003. 290 p.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1051-1055, nov./dez., 2006.

BUENO, R. C. O. F. et al. Desempenho de tricogramatídeos como potenciais agentes de controle de *pseudoplusia includens* wlaeker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 3, p. 389-394. 2009.

CARVALHO, G. A.; PARRA, J. R. P.; BAPTISTA, G. C.; Seletividade de alguns produtos fitossanitários a duas linhagens de *Trichogramma pretiosum* riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, v. 25, n. 3, p. 583-591, maio/jun., 2001.

CÉSAR FILHO, E.; ALMEIDA, R. P. Efeito de Inseticidas na emergência de *Trichogramma pretiosum* riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Rev. Oleag. Fibr.**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 43-p.48, dez. 1997.

CÔNSOLI, F. L.; ROSSI, M. M.; PARRA, J. R. P. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *T pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. São Paulo, v. 43, n. 3-4, p. 271-275, 1999.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Embrapa. **Circular Técnica**, n. 30, março, 1999.

DALVI, L. P. et al. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (Classe-Forma: Hyphomycetes) ao parasitóide *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1392-1395, set./out., 2007.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu. Rev. Entomol**, v. 52, p. 81–106, 2007.

FOERSTER, L. M. Seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides. In: PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 609 p.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de extratos de meliáceas sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**. n. 33, v. 5, p. 607-612, 2004.

HAJEK; A. E.; LEGER, R. J. S. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 293-322, 1994.

HEGAZI, E. M. et al. Naturally occurring *Trichogramma* species in olive farms in Egypt. **Insect Science**, n. 12, p. 185-192, 2005.

HODGE, K. T. Seifert<sup>3</sup> Lectotypification and status of *Isaria* Pers. **Fr. Taxon**, v. 54, n. 2, p. 485-498, may 2005.

LACEY, C. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. R. Poute of Invasion and Histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v., p. 108-118, 1988.

LEGER, R. J. S. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In.: THOMPSON; S. N.; FERERICI, B. A. **Parasites and Pathogens of Insects**. v. 2, London: Pathogens Acad. Press, 1993. p. 211-227.

LEGER; R. J. S.; COOPER; R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 167-177, 1986.

MIRANDA, M. M. M. et al. Impact of integrated pest management on the population of leafminer, fruit borers, and natural enemies in tomato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 204-208, jan./fev., 2005.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

MOURA, A. P.; CARVALHO, G. A.; RIGITANO, R. L. O. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 203-210, mar. 2005.

MOURA, A.P. et al. Selectivity evaluation of insecticides used to control tomato pests to *Trichogramma pretiosum*. **BioControl**, n. 51, p. 769–778, 2006.

NUNES, M. U. C.; HOJI, F. N. P.; VALADARES, C. C. S. Efeito do *Trichogramma pretiosum* e sua associação com inseticidas e biofertilizante no controle da traça (*Tuta absoluta*) e da broca pequena (*Neoleucinodes elegantalis*) to tomateiro estaqueados sob irrigação por aspersão e gotejamento. Embrapa, **Circular**. n.77, p.1-4, ago. 1999.

PARRA, J. R. P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In.: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.(ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324 p.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, n. 33, v. 3, p. 271-281,2004.

PRATISSOLI, D. et al. Fertility life table of *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma acacioi* on eggs of *Anagasta keuhniella* at different temperatures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 193-196, fev. 2004.

POLANCZYK, R. A. et al. Desempenho de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 495-499, jul./set., 2009.

POTRICH, M. et al. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, nov./dez., 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B. Impacto ambiental de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

TAVARES, W.S. et al. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 384-388, 2009.

VINSON, S. B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitóides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J. R. P.; Zucchi, R. A.(ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324 p.

## 5 ARTIGO C – VIRULÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A NINFAS DE MOSCA BRANCA *Bemisia tabaci*. (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)

### 5.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade e a virulência dos isolados de *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 e Unioeste 57), *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 e Esalq 09) e *Isaria* sp. (IBCB 367 e IBCB 394) a *Bemisia tabaci*. Suspensões dos isolados ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) foram pulverizadas sobre ninfas de 3<sup>o</sup> instar aderidas às folhas de couve. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições, com 20 insetos cada. A testemunha constou de água destilada esterilizada + Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%). Avaliou-se o número de ninfas mortas durante sete dias, posteriormente, mantidas em câmara úmida. Para a estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) as suspensões dos isolados,  $1,0 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$ ,  $1,0 \times 10^7$ ,  $1,0 \times 10^8$  e  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL, foram pulverizadas sobre ninfas de 3<sup>o</sup> instar. Avaliou-se o número de ninfas com mortalidade confirmada. Os isolados *B. bassiana* Unioeste 47 (84,1%) e *Isaria* sp. IBCB 367 (98,6%) não diferiram estatisticamente entre si, provocando os maiores índices de mortalidade, enquanto o isolado *M. anisopliae* Esalq 09 provocou a menor mortalidade confirmada (23,2%). A CL<sub>50</sub> dos isolados de *B. bassiana* ficou entre  $1,8 \times 10^5$  e  $4,1 \times 10^5$  conídios/mL (Unioeste 57 e Unioeste 47, respectivamente). Dentre os isolados de *M. anisopliae*, Esalq 09 apresentou maior CL<sub>50</sub> ( $7,8 \times 10^8$  conídios/mL), enquanto Unioeste 43 esteve entre as menores ( $4,3 \times 10^5$  conídios/mL). Os isolados de *Isaria* sp. apresentaram CL<sub>50</sub> de  $2,5 \times 10^5$  e  $3,1 \times 10^5$  conídios/mL (IBCB 367 e IBCB 394, respectivamente). Neste sentido, os isolados *B. bassiana* Unioeste 47 e *Isaria* sp. IBCB 367 são recomendados para controle de *B. tabaci* e para futuros trabalhos em campo.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*. *Isaria* sp. Patogenicidade. Controle biológico.

VIRULENCE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AGAINST NYMPHS WHITEFLY *Bemisia tabaci* (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)

### Abstract

The objective of this study was to evaluate the pathogenicity and virulence of isolates *Beauveria bassiana* (Unioeste 47 and Unioeste 57), *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 43 and Esalq 09) and *Isaria* sp. (IBCB 367 and IBCB 394) isolates against

*Bemisia tabaci*. Suspensions of the isolates ( $1.0 \times 10^9$  conidia/mL) were sprayed on third instar nymphs attached to cabbage leaves. It was performed four replicates, each one with 20 insects, for each treatment. The control consisted of sterile distilled water + Tween<sup>®</sup> 80 (0.01%). The number of killed nymphs was evaluated during seven days, and then they were kept in a moist chamber. To estimate the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>), isolates suspensions of  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^8$  and  $1.0 \times 10^9$  conidia/mL were sprayed on third instar nymphs. The number of nymphs with confirmed mortality was evaluated. The isolates *B. bassiana* Unioeste 47 (84.1%) e *Isaria* sp. IBCB 367 (98.6%) did not differ significantly, causing the highest mortalities. However, the isolate *M. anisopliae* Esalq 09 caused the lower confirmed mortality (23,2%). The CL<sub>50</sub> of the *B. bassiana* isolates varied from  $1.8 \times 10^5$  to  $4.1 \times 10^5$  conidia/mL (Unioeste 57 and Unioeste 47, respectively). Among the isolates of *M. anisopliae*, Esalq 09 presents the highest LC<sub>50</sub> value ( $7,8 \times 10^8$  conidia/mL), whereas Unioeste 43 presented the lowest LC<sub>50</sub> ( $4.3 \times 10^5$  conidia/mL). The *Isaria* sp. isolates presented LC<sub>50</sub> of  $2,5 \times 10^5$  and  $3,1 \times 10^5$  conidia/mL (IBCB 367 and IBCB 394, respectively). Therefore, *B. bassiana* Unioeste 47 e *Isaria* sp. IBCB 367 isolates could be recommended to *B. tabaci* control and for future field studies.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*. *Isaria* sp. Pathogenicity. Biological control.

## 5.2 INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tem sido uma alternativa lucrativa para os produtores (FILGUEIRA, 2003; CAMARGO; CAMARGO FILHO, 2008). No entanto, sofre com ataques de insetos, como a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (GALLO et al., 2002). A importância da mosca-branca vem aumentando consideravelmente nesta cultura, ao contrário da traça, que é controlada por *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (ZUCCHI; MONTEIRO, 1997; HAJI et al., 2002), muitas vezes utilizado concomitantemente com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) (HAJI et al., 2002).

A mosca branca-branca é um inseto polífago ocorrendo nas culturas do algodão, melão, melancia, abóbora, feijão, batata, hortaliças, ornamentais, soja, videira, maracujá e tomate (GALLO et al., 2002). No estado do Paraná, foram identificadas os biótipos *B. tabaci* biótipo A e *B. tabaci* biótipo B, sendo que o biótipo

A apresenta ampla distribuição geográfica, enquanto, o biótipo B está associada à maior variedade de plantas hospedeiras (MARTINEZ et al., 2000).

Os danos causados pela mosca branca no tomateiro estão relacionados ao processo de alimentação o qual reduz o vigor da planta, causa anomalias fisiológicas e deposição de grande quantidade de secreção açucarada, o que favorece a ocorrência de fumagina, além de atuarem como transmissores de vírus (GALLO et al., 2002; FILGUEIRA, 2003).

Para o controle de *B. tabaci* e *B. argentifolli* são recomendados inseticidas do grupo dos neonicotinóides, tiadiazinona, piretróides, éter piridiloxipropílico, benzoiluréia e feniltiouréia (PARANÁ-SEAB, 2010), e, como estratégia para o controle desta praga na cultura de tomate há estudos com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Isaria* sp. (Wize) Brown e Smith, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Viégas e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (WRAIGHT et al., 1998; FARIA; WRAIGHT, 2001; VAZQUEZ-MORENO, 2002; RAMOS et al., 2004).

Segundo Faria; Wraight (2001), os fungos têm capacidade de suprimir e, muitas vezes, controlar mosca branca, tanto em casa de vegetação quanto em campo. Associado a esta informação, muitos registros de epizootias de fungos entomopatogênicos em mosca branca são relatados, como de *Aschersonia* cf. *goldiana* em *B. argentifolli*<sup>4</sup> na cultura da soja no estado de São Paulo. Também na cultura da soja, foram realizadas observações e verificada alta incidência de *L. lecanii* infectando ninfas de *B. argentifolli*, além de redução significativa na população desta espécie. *Isaria fumosorosea* também é relatado ocorrendo naturalmente em ninfas de *B. tabaci*, sendo este fato relatado como comum na América do Sul (LOURENÇÃO; YUKI; ALVES, 1999; LOURENÇÃO; MIRANDA; ALVES, 2001; SCORSETTI et al., 2008). A partir de tais relatos, muitos trabalhos foram realizados com a finalidade de selecionar os isolados mais virulentos, de várias espécies de fungos entomopatogênicos, para o controle deste inseto.

Assim, na seleção de isolados de *B. bassiana* para controle de *B. argentifolli*, Vicentini; Faria; Oliveira (2001) verificaram diferenças nas virulências dos

---

<sup>4</sup> Sinonímia de *Bemisia tabaci* biótipo B, sendo descrito *Bemisia argentifolli* conforme consta no manuscrito original, o mesmo procedimento foi adotado para as demais citações.

isolados testados em ninfas. Em experimentos de laboratório, *M. anisopliae* provocou 89% de mortalidade em ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli*, sendo mais eficiente que os isolados de *B. bassiana* e de *Isaria fumosorosea* (RAMOS et al., 2004). O desenvolvimento de ninfas e adultos também pode ser comprometido pelos fungos entomopatogênicos, conforme verificado por Huang et al. (2010), segundo os quais mal-formações nas fases subseqüentes de desenvolvimento de *B. tabaci* ocorreram quando estas foram pulverizadas com *I. fumosorosea* no 2<sup>o</sup> ínstar.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade e a virulência de isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria* sp. à mosca branca *Bemisia* sp., em condições de laboratório.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.3.1 Patogenicidade e Virulência dos Fungos Entomopatogênicos a Mosca Branca *Bemisia tabaci*.

##### 5.3.1.1 Cultivo de couve *Brassica oleracea*

O cultivo de couve *Brassica oleracea* var. *georgea* foi realizado para criação da mosca branca. Para tal, sementes de couve foram distribuídas em bandejas de isopor com 128 células, contendo substrato comercial Plantmax, sendo as bandejas mantidas em casa de vegetação por 30 dias, quando foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3,5 L.

##### 5.3.1.2 Coleta e criação de *Bemisia tabaci*

Ovos, ninfas e adultos de mosca branca foram coletados em cultivo orgânico de tomate, no município de Marechal Cândido Rondon, PR. Estes insetos foram acondicionados em gaiolas (40 × 40 × 60 cm) contendo uma planta de couve,

sendo mantidas em casa de vegetação, quando necessário, as plantas foram trocadas para a manutenção da população.

Os exemplares desta espécie foram depositados na coleção entomológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Dois Vizinhos (UTFPR-DV).

### 5.3.1.3 Multiplicação e preparação das suspensões dos isolados

Os isolados utilizados foram das espécies *Beauveria bassiana*, *Isaria* sp. e *Metarhizium anisopliae*, obtidos dos bancos de entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico/ Instituto Biológico de Campinas (IBCB), Laboratório de Controle Microbiano/ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e do Laboratório de Biotecnologia Agrícola/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1** – Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e respectiva origem

Isolados	Espécie	Hospedeiro original ou substrato	Local de origem
Unioeste 43	<i>M. anisopliae</i>	Hymenoptera: Formicidae	São Miguel do Iguaçu/PR
Unioeste 47	<i>B. bassiana</i>	Hemiptera: Pentatomidae	Primavera do Leste/MT
Unioeste 57	<i>B. bassiana</i>	Hemiptera: Pentatomidae	Primavera do Leste/MT
IBCB 367	<i>Isaria</i> sp.	Solo de pastagens	Cuiabá/MT
IBCB 394	<i>Isaria</i> sp.	Solo de cana-de-açúcar	Espírito Sto. do Pinhal/SP
Esalq 09	<i>M. anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Pernambuco

Os isolados foram multiplicados em placas de Petri em meio de esporulação (M.E.) à temperatura de  $26 \pm 1$  °C e fotofase de 14 h, por 8 dias. Posteriormente, os conídios foram coletados e armazenados em frascos esterilizados, em freezer, à temperatura de  $-10 \pm 1$  °C (ALVES et al., 1998). Os conídios foram suspensos em 10 mL de água destilada esterilizada + Tween<sup>®</sup> 80

(0,01%) e agitados em vórtex por um minuto, sendo a suspensão quantificada em câmara de Neubauer, padronizada em  $1,0 \times 10^2$  conídios/mL. Em seguida, 0,1 mL da suspensão foram espalhados com alça de Drigalski em placa de Petri contendo M.E. e, incubadas em câmara climatizada ( $26 \pm 1$  °C; fotofase de 14 h), por oito dias. Após a formação das colônias, uma foi repicada para outra placa, obtendo-se a cultura monospórica, sendo a multiplicação dos isolados monospóricos realizada conforme descrito anteriormente, e os conídios coletados, armazenados por um período não superior a 15 dias.

A partir destes, foram preparadas suspensões com água destilada esterilizada + Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%), agitadas por um minuto em Vórtex e quantificadas em câmara de Neubauer, padronizadas em  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL.

#### 5.3.1.4 Patogenicidade de isolados para controle de mosca branca

Para a obtenção de ninfas de mesmo ínstar, foram selecionadas mudas de couve com folhas de aproximadamente 15 cm de comprimento. Em cada folha foram confinados 30 pares de *B. tabaci* utilizando-se gaiolas de 12 × 20 cm confeccionadas com tecido *voil*. Após 24 h, os adultos foram retirados e após 15 dias as folhas foram destacadas da planta e as ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar foram utilizadas para os bioensaios por serem imóveis, permitindo a manipulação das mesmas (JAMES; BUCKNER; FREEMAN, 2003). As ninfas aderidas às folhas de couve foram selecionadas com o auxílio de microscópio estereoscópico, sendo feitas marcações ao lado de cada uma conforme metodologia descrita por James; Jaronski (2000) e Vicentini; Faria; Oliveira (2001).

As suspensões dos fungos na concentração de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL foram pulverizadas, com auxílio de um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Fanem<sup>®</sup> de pressão constante 1,2 kgf/cm (procedimento também utilizado nos demais testes), sobre as ninfas aderidas às folhas de couve. Posteriormente, os pecíolos das folhas de couve foram imersos em recipientes plásticos contendo ágar-água (1,5%) para que as folhas se mantivessem túrgidas, (metodologia adaptada de WRIGHT et al., 2000), sendo os potes revestidos com

capa de *voil*, para evitar fuga dos insetos adultos. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições, cada uma contendo 20 insetos. Na testemunha, as plantas foram pulverizadas somente com água destilada esterilizada + Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%). Após o procedimento, os recipientes foram acondicionados em câmara climatizada a  $26 \pm 1$  °C e fotofase de 14 h, conforme Vidal; Fargues; Lacey (1997).

Diariamente, avaliou-se o número de ninfas mortas durante o período de sete dias, conforme Landa et al. (1994) e James; Jaronski (2000). Para confirmar a mortalidade provocada pelo fungo, os insetos mortos, fixos nas folhas de couve, foram mantidos nos recipientes plásticos contendo ágar-água, vedados e acondicionados em câmara climatizada a  $26 \pm 1$  °C e fotofase de 14 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância (teste F), sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico BioEstat<sup>®</sup> (AYRES et al., 2003).

#### 5.3.1.5 Estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>)

Os isolados foram multiplicados conforme metodologia já descrita, e foram preparadas suspensões de conídios nas concentrações de  $1,0 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$ ,  $1,0 \times 10^7$ ,  $1,0 \times 10^8$  e  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL (metodologia adaptada de QUESADA-MORAGA et al., 2006), conforme procedimento descrito no item 5.3.1.3. A mortalidade foi avaliada ao 7<sup>o</sup> dia e, posteriormente, foi confirmada a mortalidade conforme descrito no item 5.3.1.4. A fim de estimar a CL<sub>50</sub>, os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Bartlett, sendo posteriormente ajustados ao modelo Binomial com função de ligação Probit, os dados não ajustados ao modelo Probit foram ajustados ao modelo Logaritmo de regressão com auxílio do programa estatístico R<sup>®</sup> (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Patogenicidade de Isolados para Controle de Mosca Branca

Os isolados *Isaria* sp. IBCB 367 (98,6%) e *B. bassiana* Unioeste 47 (84,1%) não diferiram estatisticamente entre si, apresentando os maiores índices de mortalidade confirmada. No entanto, o isolado *M. anisopliae* Esalq 09 provocou a menor mortalidade (23,2%) (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2** – Mortalidade confirmada (%) ( $\pm$  EP) de *Bemisia tabaci* pulverizadas com fungos entomopatogênicos. Temp.  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e 14 horas de fotofase.

Tratamentos	Mortalidade Confirmada
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	84,1 $\pm$ 2,39 ab
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	76,8 $\pm$ 7,91 bc
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	71,0 $\pm$ 3,54 bc
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	23,2 $\pm$ 9,44 d
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	98,6 $\pm$ 1,25 a
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	65,2 $\pm$ 6,77 c
<i>P</i>	0,001

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Isolados de *B. bassiana*, na concentração de  $0,6-1,4 \times 10^3$  conídios/mm<sup>2</sup>, apresentaram potencial de controle de 90% sobre ninfas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli*, sete dias após a aplicação (WRAIGHT et al. 2000). No entanto, outros isolados de *B. bassiana* (concentração de  $1,2 \times 10^4$  conídios/cm<sup>2</sup>), provocaram apenas 25,7% de mortalidade em ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar, desta mesma espécie (VICENTINI; FARIA; OLIVEIRA, 2001). Este fato poderia estar relacionado à

suscetibilidade de cada ínstar das ninfas utilizadas nos respectivos trabalhos. No entanto, no primeiro trabalho foi utilizado o ínstar mais suscetível e o menos suscetível, 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstar, respectivamente, enquanto no segundo trabalho foi utilizado um ínstar com suscetibilidade intermediária, 1<sup>o</sup> ínstar, segundo James; Buckner; Freeman (2003). No presente trabalho, os dados obtidos utilizando ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar e aplicando o isolado *B. bassiana* Unioeste 47 se assemelham aos obtidos por Wraight et al. (2000).

Também estudando a patogenicidade de *B. bassiana* ( $6,0 \times 10^8$  conídios/mL), Saito; Sugiyama (2005) verificaram que cinco dias após a aplicação do fungo, 60% das ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli* estavam mortas. Contudo, ninfas deste mesmo ínstar e desta mesma espécie apresentaram variações de 2 a 70% na mortalidade com o isolado de *B. bassiana* ( $1,0 \times 10^7$  conídios/mL) (RAMOS et al., 2004). Frente a isto, verifica-se que além da variante ínstar, deve-se analisar a patogenicidade e a virulência dos isolados testados.

Estudos semelhantes foram realizados com *B. bassiana* ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL) que provocou mortalidade em 71,5% das ninfas de 1<sup>o</sup> ínstar de *B. tabaci* porém, não apresentou atividade ovicida (RAMOS et al., 2000). Por outro lado, Quesada-Moraga et al. (2006) verificaram mortalidade de 77,7% em ninfas de 4<sup>o</sup> ínstar dessa espécie, quando pulverizadas com os isolados mais virulentos de *B. bassiana* na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL. Mortalidade semelhante foi obtida por Santiago-Álvarez et al. (2006), quando ninfas de *B. tabaci* foram pulverizadas com *B. bassiana*, ficando entre 68 e 73%. Observou-se que as ninfas de *B. tabaci* infectadas por *B. bassiana* apresentaram coloração rosa-avermelhada, relacionada a presença de oosporina, substância que inibe a colonização do inseto por outro microrganismo, sendo este aspecto também verificado por Wraight et al. (1998) e Ramos et al. (2004).

No presente trabalho, o isolado *M. anisopliae* Esalq 09, na concentração de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL, provocou a menor mortalidade confirmada (23,2%). No entanto, este isolado, na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL, em estudos realizados por Ramos et al. (2004), provocou mortalidade em 89% das ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli*. Já o isolado IBCB 367 de *Isaria* sp. causou

98,6% de mortalidade em ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar. Apesar disso, o outro isolado de *Isaria* sp., IBCB 394, provocou 65,2% de mortalidade. Em estudos realizados com *I. fumosorosea* na concentração de  $5,0 \times 10^4$  conídios/cm<sup>2</sup>, Vidal et al. (1998) verificaram mortalidade de ninfas de 2<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli* superior a 70%, semelhante ao observado por Lacey et al. (1999) (77% de mortalidade em ninfas de 2<sup>o</sup> ínstar). No entanto, em ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar, Ramos et al. (2004) verificaram que *I. fumosorosea* foi pouco virulento na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL, aos cinco dias após a aplicação. Apesar de *I. fumosorosea* ter se mostrado pouco virulento, esses autores verificaram que as ninfas foram rapidamente infectadas e mortas, fato relacionado a germinação dos conídios. Conídios de *I. fumosorosea* apresentam germinação significativa sobre *B. argentifolli*, oito horas após a aplicação, chegando a 99% de germinação após 24 h (LANDA et al., 1994; VEGA; JACKSON; McGUIRE, 1999).

Dados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, em que *Isaria* sp. IBCB 367 causou 98,6% de mortalidade, foram obtidos por Saito; Sugiyama, 2005, que verificaram que *I. fumosorosea* ( $6,0 \times 10^8$  conídios/mL) provocou 98% de mortalidade em ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli*

No presente trabalho, as espécies de fungos entomopatogênicos que provocaram os maiores índices de mortalidade confirmada foram *Isaria* sp. e *B. bassiana*, corroborando o estudo de Wraight et al. (2000). A espécie *I. fumosorosea* tem como vantagem a germinação rápida sobre ninfas de *B. argentifolli*, quando comparada a outras espécies de fungos (LANDA et al., 1994), sendo esta habilidade de germinação também verificada por Vega, Jackson, McGuire (1999). Os isolados que apresentam germinação mais rápida são mais desejáveis para infectar estágios imaturos, além de não correrem o risco de serem eliminados durante a ecdise.

A germinação dos conídios parece ser influenciada pelo ambiente nutricional externo a que o isolado entra em contato (VEGA; JACKSON; McGUIRE, 1999), sendo que o tegumento do inseto pode ser considerado como fonte de nutrientes pelos isolados (RAMOS et al., 2004). Porém, para que ocorra a germinação dos conídios é necessária a adesão destes ao inseto. Esse processo é favorecido pelas propriedades hidrofóbicas do conídio (BOUCIAS et al., 1988 *apud*

LEITE et al., 2003), que apresentam afinidade à cutícula dos insetos, de composição lipídica (GALLO et al., 2002).

A adesão de conídios de *M. anisopliae* ocorre, concomitantemente, com a deposição de uma camada de secreção mucilaginosa para hidratar o conídio, evitando sua dessecação e, melhorando a adesão (LEGER, 1993). Conídios de *B. bassiana* se aderem rapidamente em superfícies hidrofóbicas, no entanto, podem ser facilmente removidos dessas superfícies (HOLDER; KEYHANI, 2005). A mosca-branca *B. argentifolli* apresenta na composição da sua cutícula, uma espessa camada de lipídios de cadeia longa e ésteres de cera que podem facilitar a adesão dos conídios, como podem ter efeito tóxico ou inibidor sobre estes, atuando como primeira linha de defesa contra os fungos (BUCKNER; HAGEN; NELSON, 1999 *apud* JAMES; BUCKNER; FREEMAN, 2003), também podem afetar a germinação, apresentando atividade fungistática (JAMES, BUCKNER, FREEMAN, 2003).

Os ácidos graxos que ocorrem sobre o tegumento dos insetos diferem em quantidade e qualidade, sendo que os de cadeia longa permitem a germinação de conídios, mas provocam autólise no tubo germinativo, evitando o crescimento das hifas (ALVES, 1998). Outros componentes presentes na cutícula podem também apresentar efeito fungistático a uma espécie ou isolado de fungo entomopatogênico (SOSA-GÓMEZ; BOUCIAS; NATION, 1997). Assim, para que o fungo cause infecção ele deve transpor estas barreiras de resistência, capacidade que difere entre os isolados (LEGER, 1993).

Assim, comparando isolados de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* sobre ninfas de *B. argentifolli*, Saito; Sugiyama (2005) verificaram que os isolados de *I. fumosorosea* foram os mais virulentos a este inseto, não sendo observado efeitos negativos dos lipídios sobre esse isolado. O mesmo pode ser observado no presente trabalho, sugerindo que o efeito tóxico, inibidor ou fungistático possa ter ocorrido somente, ou em maior proporção, sobre o isolado *M. anisopliae* Esalq 09. As diferenças observadas podem estar relacionadas ao muco produzido por alguns isolados, que apresentam propriedades antidessecantes e protegem os conídios dos efeitos tóxicos dos polifenóis do hospedeiro (LEGER, 1993).

A espécie *I. fumosorosea*, após se aderir, consegue utilizar os lipídios da cutícula como fonte de nutrientes, quando outros nutrientes estão em falta (JAMES; BUCKNER; FREEMAN, 2003). Esse evento é possível devido à produção

de lipases e estereases pelo fungo, que degradam a cutícula para então penetrar, conseqüentemente, servindo de nutriente para estes. A produção de lipases por certos fungos, também descrito para *B. bassiana*, pode estar relacionada à sua virulência (HAJEK; LEGER, 1994; LEGER, 1995; ALVES, 1998).

#### 5.4.2 Estimativa da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>)

Pelos testes de normalidade de Shapiro Wilk e de homogeneidade de variância de Bartlett, os isolados Unioeste 57, Unioeste 43, Esalq 09 e IBCB 394 apresentaram distribuição normal e homogeneidade. No entanto, Unioeste 47 e IBCB 367 não foram significativos para estes testes. Também foi realizada a estimativa dos parâmetros do modelo, considerando o modelo Binomial com função de ligação Probit, através da estimativa da *Deviance* (função desvio), verificando que todos se apresentaram ajustados ao modelo  $\eta_i = \beta + \alpha_i$  (Tabela 5.3). Porém, o único isolado a se ajustar no modelo Probit e ser significativo foi IBCB 367. Assim realizou-se a estimativa dos parâmetros pelo coeficiente de regressão, com modelo logaritmo:  $proporção = \beta_0 + \beta_1 \cdot \ln(dose)$  (Tabela 5.4).

A estimativa da CL<sub>50</sub> com a utilização do modelo Probit, em testes envolvendo entomopatógenos, nem sempre é possível, pois os bioensaios não são do tipo estímulo-resposta, por isso, muitas vezes, os dados não se enquadram no modelo, devendo ser utilizado outro modelo (HADDAD, 1998), conforme verificado no presente trabalho.

**Tabela 5.3** – Estimativa da deviance (função desvio) de cada modelo encaixado com seus respectivos graus de liberdade, considerando o modelo Binomial com função de ligação probit, estimativa dos parâmetros do modelo, considerando o modelo Binomial com função de ligação probit.

Tratamentos	$\beta$ (intercepto)	$\alpha_i$ (estimativa do efeito da dose)	Grau de Liberdade	Valor tabelado $\chi^2$ (5%)	Deviance*
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	0,38	$1,00 \times 10^{-9}$	18	28,87	5,67*
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	0,067	$1,72 \times 10^{-9}$	18	28,87	4,10*
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	-0,059	$1,16 \times 10^{-9}$	18	28,87	4,35*
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	-0,59	$2,74 \times 10^{-10}$	18	28,87	2,48*
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	-0,395	$3,62 \times 10^{-8}$	18	28,87	2,83*
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	0,034	$8,76 \times 10^{-10}$	18	28,87	5,59*

\*Deviance < valor tabelado  $\chi^2$  modelo bem ajustado.

**Tabela 5.4** – Concentração Letal média (CL<sub>50</sub>) de isolados de fungos entomopatogênicos a *B. tabaci* Temp. 26 ± 2 °C e 14 horas de fotofase.

Tratamentos	$\beta_0$ (p valor)	$\beta_1$ (p valor)	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub>
<i>B. bassiana</i> Unioeste 47	-0,3487 (1,0×10 <sup>-2</sup> )*	0,0657 (1,0×10 <sup>-3</sup> )*	0,613	4,1×10 <sup>5</sup>
<i>B. bassiana</i> Unioeste 57	-0,6037 (4,3×10 <sup>-4</sup> )*	0,0765 (4,8×10 <sup>-8</sup> )*	0,816	1,8×10 <sup>5</sup>
<i>M. anisopliae</i> Unioeste 43	-0,6775 (7,9×10 <sup>-6</sup> )*	0,0304 (9,4×10 <sup>-10</sup> )*	0,881	4,3×10 <sup>5</sup>
<i>M. anisopliae</i> Esalq 09	-0,1925 (1,4×10 <sup>-1</sup> )*	0,0304 (7,0×10 <sup>-4</sup> )*	0,475	7,8×10 <sup>8</sup>
<i>Isaria</i> sp. IBCB 367	-1,0287 (1,7×10 <sup>-7</sup> )*	0,1037 (6,4×10 <sup>-11</sup> )*	0,912	2,5×10 <sup>5</sup>
<i>Isaria</i> sp. IBCB 394	-0,5460 (8,0×10 <sup>-3</sup> )*	0,0700 (5,7×10 <sup>-6</sup> )*	0,690	3,1×10 <sup>5</sup>

\* p < 0,05: estimativas são diferentes de zero.

A Concentração letal média (CL<sub>50</sub>) dos isolados de *B. bassiana* ficou entre  $1,8 \times 10^5$  e  $4,1 \times 10^5$  conídios/mL para Unioeste 57 e Unioeste 47, respectivamente. Dentre os isolados de *M. anisopliae*, o isolado Esalq 09 apresentou a maior CL<sub>50</sub>,  $7,8 \times 10^8$  conídios/mL, o que identifica o isolado como pouco virulento. Os isolados de *Isaria* sp. apresentaram CL<sub>50</sub> baixa, ficando em  $3,1 \times 10^5$  conídios/mL para IBCB 394 e  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL para IBCB 367 (Tabela 5.4). Valores de CL<sub>50</sub> dos isolados de *B. bassiana* semelhantes aos obtidos no presente trabalho, foram verificados por Quesada-Moraga; Maranhão; Valverde-Garcia (2006), que obtiveram na menor CL<sub>50</sub>  $6,53 \times 10^5$  conídios/mL.

No entanto, a CL<sub>50</sub> de *Isaria* sp. observada no presente trabalho é maior do que a CL<sub>50</sub> de *I. fumosorosea* obtida por Saito; Sugiyama (2005), calculada em  $1,1 \times 10^4$  conídios/mL para ninfas de 3<sup>o</sup> ínstar de *B. argentifolli*, sendo mais virulento do que o testado no presente trabalho. Porém, para esta mesma espécie, Huang et al. (2010) obtiveram  $2,16 \times 10^6$  conídios/mL para controle de ninfas de 2<sup>o</sup> ínstar de *B. tabaci*.

Em experimentos realizados por Wraight et al. (1998) verificou-se que a alta virulência a *B. argentifolli* esteve associada a *I. fumosorosea* e *B. bassiana*, sendo o mesmo observado no presente trabalho. Segundo Leger (1993) a virulência de deuteromicetos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria* sp.) é, frequentemente, relacionada à rápida germinação de conídios sobre o hospedeiro e aos índices de crescimento do entomopatógeno.

A proteína Mad1 e as dextruxinas, toxinas de *M. anisopliae*, são determinantes da virulência desse entomopatógeno (KERSHAW et al., 1999; WANG; LEGER, 2007). Sendo assim, os isolados mais virulentos, como Unioeste 43, poderiam apresentar a dextruxina na sua composição. No entanto, segundo Leger (1993), nenhum componente sozinho ou ação pode ser considerado o determinante da virulência de um isolado.

## 5.5 CONCLUSÕES

Os isolados *B. bassiana* Unioeste 47 e *Isaria* sp. IBCB 367 apresentam potencial para serem utilizados em programas de controle de *B. tabaci*, uma vez que foram patogênicos a este inseto e apresentaram CL<sub>50</sub> de  $4,1 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL, respectivamente. Por outro lado, o isolado *M. anisopliae* Esalq 09 não é recomendado, pois apresentou baixo índice de mortalidade confirmada além de CL<sub>50</sub> elevada,  $7,8 \times 10^8$  conídios/mL.

## 5.6 REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S. B. et al. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

AYRES, M. et al. **BioEstat 3.0. aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq, 2003. 290 p.

CAMARGO, F. P.; CAMARGO FILHO, W.P.C. Produção de tomate de mesa no Brasil, 1990-2006: contribuição da área e da produtividade. **Horticultura Brasileira**. v. 26, n. 2, p. 1018-1021, jul./ago. 2008.

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

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual e olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

GALLO, D. O. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.

HADDAD, M. L. Utilização do polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 999-1014, 1163 p.

HAJEK; A. E.; LEGER, R. J. S. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 293-322, 1994.

HAJI, F. N. P. et al. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro. In: PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 609 p.

HOLDER, D. J.; KEYHANE, N. O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5260–5266, sept., 2005.

HUANG, Z. et al. Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. **Insect Science**, v. 17, p. 140–148, 2010.

JAMES, R. R.; JARONSKI, S. T. Effect of low viability on infectivity of *Beauveria bassiana* Conidia toward the Silverleaf Whitefly. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p. 227–228, 2000.

JAMES, R. R.; BUCKNER, J. S.; FREEMAN, T. P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage effect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, p. 67-74, 2003.

KERSHAW, M. J. et al. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 213-223, 1999.

LACEY, L. A. et al. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Against *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 9-18, 1999.

LANDA, Z. et al. A bioassay for Determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. **Biological Control**, v. 4, p. 341-350, 1994.

LEITE, L. G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: AS Pinto, 2003. 92 p.

LEGER, R. J. S. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In.: THOMPSON; S. N.; FERERICI, B. A. **Parasites and pathogens of insects**. London: Pathogens Acad. Press, 1993. v.2, p. 211-227.

LEGER, R. J. S. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. **Can. J. Bot.**, v. 73, 1995.

LOURENÇÃO, A. L.; YUKI, V.A.; ALVES, S. B. Epizootia de *Aschersonia cf. goldiana* em *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biótipo B no estado de São Paulo. **Anais. Soc. Entomol. do Brasil**, v. 28, p. 343-345, 1999.

LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. A. C.; ALVES, S. B. Ocorrência epizoótica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado do Maranhão. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 183-185, 2001.

MARTINEZ, S. S. et al. A. Identification, geographical distribution and host plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotypes (Homoptera: Aleyrodidae) in the state of Paraná, Brazil. **An. Soc. Entomol. Brasil**. v. 29, n. 3, p. 597-603, 2000.

PARANÁ. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB). **Lista de Agrotóxicos aptos para comércio e uso no Paraná**. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Lista.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2010b.

QUESADA-MORAGA, E. et al. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. **Biological Control**, v. 36, p. 274–287, 2006.

RAMOS, E.Q. et al. Susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a *Beauveria bassiana* em condiciones de laboratorio. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, n. 56, p. 65-69, 2000.

RAMOS, E. Q. et al. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**. v. 73, p. 21-28, 2004.

SAITO, T.; SUGIYAMA, K. Pathogenicity of three Japanese strains of entomopathogenic fungi against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 40, n. 1, p. 169–172, 2005.

SANTIAGO-ÁLVARES, C. et al. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. **BioControl.**, v. 51, p. 519–532, 2006.

SCORSETTI, A. C. et al. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. **BioControl.**, v. 53, p. 787–796, 2008.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; BOUCIAS, D. G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 31–39, 1997.

VAZQUEZ-MORENO, L. L. Advances in the biological control of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Neotropical region. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, v. 66, p. 82-95, 2002.

VEGA, F. A.; JACKSON, M. A.; MCGUIRE, M. R.. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Mycopathologia**. v. 147, p. 33–35, 1999.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L. A. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 18-26, 1997.

VIDAL, C. et al. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. **Biological Control**, v. 12, p. 191-199, 1998.

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

WANG, C.; St. LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**. v. 6, n. 5, p. 808-816, may, 2007.

WRAIGHT, S.P. et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 71, p. 217-226, 1998.

WRAIGHT, S.P. et al. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Biological Control**, v. 17, p. 203-217, 2000.

ZUCCHI, R. A.; MONTEIRO, R. C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.(ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324 p.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo possibilitam o conhecimento sobre as interações entre fungos entomopatogênicos e o parasitóide *T. pretiosum*. Os efeitos destes entomopatógenos variaram entre os isolados e entre as técnicas de pulverização testadas, interferindo nos parâmetros biológicos do parasitóide. Contudo, estas interferências foram mínimas, quando considerada a alta concentração dos conídios ( $1,0 \times 10^9$  conídios/mL) pulverizados, expondo *T. pretiosum* à condição extrema. Desse modo, todos os isolados apresentam potencial para serem utilizados concomitantemente com *T. pretiosum*, destacando a aplicação dos isolados após a liberação de *T. pretiosum*, a fim de não provocar repelência no parasitismo. Todos os isolados foram patogênicos a *B. tabaci*, sendo *B. bassiana* Unioeste 47 e *Isaria* sp. IBCB 367 os mais virulentos. Assim, esses isolados podem ser utilizados para futuros trabalhos de associação com *T. pretiosum* em semi-campo e em campo.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. E. M.; MACHADO, L. A. Fungos Entomopatogênicos. In.: BATISTA FILHO, A. (coord.). **Controle Biológico de Insetos e Ácaros..** São Paulo: Instituto Biológico, 2006. (Boletim Técnico. Instituto Biológico, 15)
- ALVES, S. B. Patologia e Controle Microbiano: vantagens e desvantagens. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **Controle Microbiano de Insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a.
- ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **Controle Microbiano de Insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b.
- AMAYAN, M. Efecto de algunos inseticidas sobre la accion parasítica Del *Trichogramma pretiosum* (Riley) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados despues de las aplicaciones. **Lês Trichogrammes**, Antibes, France, v. 20-23, avril p. 197-199, 1982.
- ANDERSON, P. K; MARKHAM, R. H. (ed.). **Whiteflies and Whitefly-borne Viruses in the Tropic: Building a Knowledge Base for Global Action.** Cali, Colombia. 2004. 351 p.
- ANVISA. Ministério da Saúde. **Divulgado resultado do monitoramento de agrotóxicos em alimentos.** 2008. Disponível em: [www.portal.anvisa.gov.br](http://www.portal.anvisa.gov.br). Acesso em: 05 maio 2010.
- BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1051-1055, nov./dez., 2006.
- BUENO, A. F. et al. Effects of pesticides used in soybean crops to the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1495-1503, set., 2008.
- CAMARGO FILHO, W. P. et al. Evolução da Produção de tomate no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 41-69, jan.,1994.

CAMARGO F. P.; CAMARGO FILHO W. P. Produção de tomate de mesa no Brasil, 1990-2006: contribuição da área e da produtividade. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 1018-1021, jul.-ago., 2008.

CARDONA, C. et al. **Biología y Manejo de la Mosca Blanca *Trialeurodes vaporariorum* em Habichuela y Fríjol**. Colômbia: CIAT, 2005. 50 p.

CARVALHO, G. A.; PARRA, J. R. P.; BAPTISTA, G. C. Ação residual de alguns inseticidas pulverizados em plantas de tomateiro sobre duas linhagens de *Trichogramma pretiosum* riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em casa-de-vegetação. **Ciênc. e agrotec.**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 770-775, out./dez., 1999

CARVALHO, G. A.; PARRA, J. R. P.; BAPTISTA, G. C. Seletividade de alguns produtos fitossanitários a duas linhagens de *Trichogramma pretiosum* riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, v. 25, n. 3, p. 583-591, maio/jun., 2001.

CIOCIOLA JÚNIOR, A. I. et al. Impacto de Inseticidas sobre a emergência de *Trichogramma pretiosum*, Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 23, n. 3, p. 589-592, jul./set., 1999.

CÔNSOLI, F. L.; ROSSI, M. M.; PARRA, J. R. P. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. São Paulo, v. 43, n.3/4, p. 271-275, mar./abr., 1999.

CÔNSOLI, F. L.; VINSON, S. B. Parasitóides (Hymenoptera). In.: PANIZZI, A. R. e PARRA, J. R. P. (ed.) **Bioecologia e nutrição de insetos. base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Infomação Tecnológica, 2009.

COSTA, V. A.; PERIOTO, N. W. Insetos Parasitóides. In.: BATISTA FILHO, A. (coord.). **Controle biológico de insetos e ácaros**. São Paulo: Instituto Biológico, 2006. (Boletim Técnico. Instituto Biológico, 15.)

CUTHBERTSON, A. G.; WALTERS, K. F. A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Lecanicillium muscarium*, against the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* under laboratory and glasshouse conditions. **Mycopathologia**: v. 160, p. 315-319, 2005.

DALVI, L. P. et al. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (Classe-Forma: Hyphomycetes) ao parasitóide *Trichogramma atopovirilia* Oatman &

Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1392-1395, set./out., 2007

FARGUES, J. et al. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. **Biological Control**. v. 28, p. 320-331, 2003.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual e olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p

GIOLO, F. P. et al. Seletividade de agrotóxicos indicados na produção integrada de pêssego a *Trichogramma pretiosum* riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 222-225, ago., 2005.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de extratos de meliáceas sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 5, p. 607-612, set./out., 2004.

HAJI, F. N. P. Controle da traça do tomateiro com *Trichogramma*. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.(ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997.

HAJI, F. N. P. et al. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro. In: PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002

HODGE, K. T. et al. Lectotypification and status of *Isaria* Pers. **Fr. Taxon**. v. 54, n. 2, p. 485–489, may, 2005:

HUMBER, R. A. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. **ARSEF**, nov. 2007.

JACOBS, R. J.; KOUSKLEKAS, C. A.; GROSS JR., H. R. Responses of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to residues of permethrin and endosulfan. **Alabama Agricultural Experiment Station**. Auburn University, Auburn, Alabama, v. 13, n. 2, p. 355-358, apr., 1954.

JAMES, R. R.; BUCKNER, J. S.; FREEMAN, T. P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage effect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 84, p. 67-74, 2003.

LEITE, L. G. et al. **Produção de Fungos Entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: AS Pinto, 2003. 92 p.

LEITE, G. L. D. Resistência de tomates a pragas. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v. 6, n. 2, jul./dez. 2004

LOURENÇÃO, A. L.; YUKI, V. A.; ALVES, S. B. Epizootia de *Aschersonia* cf. *goldiana* em *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biótipo B no Estado de São Paulo. **Anais. Soc. Entomol. do Brasil**. v. 28, p. 343-345, 1999.

LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. A. C.; ALVES, S. B. Ocorrência epizoótica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado do Maranhão. **Neotropical Entomology**. v. 30, p. 183-185, 2001.

LOURENÇÃO, A. L. Situação atual da mosca branca no Brasil: medidas de controle. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 153-155, jul./dez., 2002.

MAGALHÃES, B. P.; MONNERAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatógenos, parasitóides e predadores. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

MEDEIROS, M. A.; VILELA, N. J.; FRANÇA, F. H. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**. v. 24, p. 180-184, 2006.

MORANDI FILHO, W. J. et al. Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1072-1078, jul-ago, 2006.

MOURA, A. P.; CARVALHO, G. A.; RIGITANO, R. L. O. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 40, n. 3, p. 203-210, mar. 2005.

MOURA, A. P. et al. Selectivity evaluation of insecticides used to control tomato pests to *Trichogramma pretiosum*. **BioControl**, v. 51, p. 769–778, 2006.

NAIKA, S. ET AL. A cultura do tomate produção, processamento e comercialização. Agromisa: Wagenigen, 2006. v. 17.  
OLIVEIRA, R. C.; PRATISSOLI, D.; BUENO, A. F. Efeito de *Azadirachta indica* (Nim) sobre o parasitismo de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Rev. Ecosystema**, v. 28, n. 12, jan.-dez., 2003.

PARANÁ. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB). **Estimativas da Produção 2009/2010**. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br>>. Acesso em: 26 abr. 2010a.

PARANÁ. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB). **Lista de Agrotóxicos aptos para comércio e uso no Paraná**. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Lista.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2010b.

PARRA, J. R. P. et al. Controle Biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: \_\_\_\_\_. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 3, p. 271-281, mai.-jun., 2004.

PINTO, J. D. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidóptera. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997.

POLANCZYK, R.A. et al. Desempenho de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 495-499, jul./set., 2009.

POTRICH, M. et al. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 822-826, 2009.

RAMALHO, F. S.; SILVA, V. L. B.; JESUS, F. M. M. Efeitos residuais de inseticidas sobre *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; Brasília, v. 24, n. 3, p. 315-319, mai./jun., 1989.

RAMOS, E. Q. et al. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**. v. 73, p. 21-28, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B. Impacto ambiental de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

TAVARES, W. S. et al. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**. v. 30, p. 384-388, 2009.

VAZQUEZ-MORENO, L. L. Advances in the biological control of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Neotropical region. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**: v. 66, p. 82-95, 2002.

VIDAL, C. et al. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. **Biological Control**, v. 12, p. 191-199, 1998.

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

VINSON, S. B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitóides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997.

WRAIGHT, S. P. et al. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Biological Control**. v. 17, p. 203-217, 2000.

ZUCCHI, R. A.; MONTEIRO, R. C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (ed.) ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997,