



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO/MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL

TALINE DE LIMA SILVA

**CONTROLE BIOLÓGICO DE IMATUROS DE *Bactrocera carambolae*
(DIPTERA: TEPHRITIDAE) POR *Metarhizium* spp. NO ESTADO DO
AMAPÁ**

**Macapá
2015**

TALINE DE LIMA SILVA

**CONTROLE BIOLÓGICO DE IMATUROS DE *Bactrocera carambolae*
(DIPTERA: TEPHRITIDAE) POR *Metarhizium* spp. NO ESTADO DO
AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pos-Graduação
Mestrado em Desenvolvimento Regional da Universidade
Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de
Mestre em Desenvolvimento Regional.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Adaime

Coorientador: Dr. Adilson Lopes Lima

Linha de pesquisa: Organização do Território, Meio Ambiente
e Desenvolvimento Regional

**Macapá
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

630

S586c Silva, Taline de Lima.

Controle biológico de imaturos de *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) por *Metarhizium* spp. no estado do Amapá / Taline de Lima Silva; orientador, Ricardo Adaime; co-orientador, Adilson Lopes Lima. – Macapá, 2015.

36 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional.

1. Agricultura - Produção. 2. Fungos entomopatogênicos. I. Adaime, Ricardo, orientador. II. Lima, Adilson Lopes, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

TALINE DE LIMA SILVA

CONTROLE BIOLÓGICO DE IMATUROS DE *Bactrocera carambolae* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) POR *Metarhizium* spp. NO ESTADO DO AMAPÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Desenvolvimento Regional da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Regional.

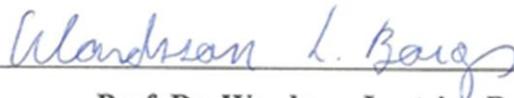
Avaliado em: 23/09/2015

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Adaime

Orientador (UNIFAP / Embrapa Amapá)



Prof. Dr. Wardsson Lustrino Borges

Membro interno (UNIFAP / Embrapa Amapá)



Prof. Dr. Lailson do Nascimento Lemos

Membro externo (FAPEAP)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde concedida a mim e minha família e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Adaime, e meu Coorientador, Dr. Adilson Lopes Lima, pela preocupação, ajuda, incentivo e pelas contribuições sem as quais este trabalho não se realizaria.

À Dra. Cristiane Ramos de Jesus Barros, pelas contribuições e incentivo.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá, pela estrutura cedida para a realização do trabalho.

Ao Dr. Gilberto Yokomizo, pela ajuda e compreensão.

Ao Dr. Rogério Biaggioni Lopes, pesquisador do Laboratório de Micologia dos Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília, pela identificação das espécies de *Metarhizium* utilizadas neste trabalho.

À M.Sc. Ana Cristina F. Salim, analista em Geoprocessamento da Embrapa Amapá, pela elaboração da Figura 1.

Ao M.Sc. José Francisco Pereira, pesquisador da Embrapa Amapá, pelas análises estatísticas realizadas neste trabalho.

À M.Sc. Adriana Bariani, analista da Embrapa Amapá, pela preocupação e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Senhor Carlos Alberto Moraes, pela coleta do solo em campo.

À Universidade Federal do Amapá - UNIFAP e ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha família, em especial minha mãe Maria Rosália, por estar sempre ao meu lado, me ajudando.

Ao meu namorado, Erick Silva dos Santos, pelo permanente e incondicional apoio, companheirismo e carinho durante mais esta etapa.

À Maria do Socorro M. de Sousa, pela amizade, companhia, preocupação e pela ajuda fundamental na realização dos experimentos.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização desta pesquisa.

Obrigada.

RESUMO

Uma das espécies de insetos economicamente importantes para a fruticultura brasileira é a mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock), praga quarentenária até o momento restrita aos estados do Amapá e Roraima. Essa praga causa danos diretos aos frutos, eleva os custos de produção, além de ser considerada uma barreira fitossanitária à exportação de frutas frescas. No Amapá, a produção de frutas é realizada em sua maior parte por agricultores familiares e a presença desta praga dificulta a comercialização local, afetando a geração de emprego e renda. O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp. sobre imaturos de *B. carambolae* em condições de laboratório. Foram coletadas amostras de solo nos municípios de Oiapoque e Macapá e a partir dessas amostras foram isolados os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*. Na análise de qual meio de cultivo as espécies de *Metarhizium* apresentam maior esporulação, foram testados os meios Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Sabouraud-Dextrose-Ágar (SDA) e Extrato de Malte-Ágar (EMA ou MEA). Para verificar a mortalidade de larvas de 3º instar de *B. carambolae*, soluções contendo 1×10^7 conídios/mL de cada isolado foram utilizadas em tratamentos contendo vermiculita, solos estéril e não estéril. Os dados foram submetidos à análise da variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo software estatístico “R”. O isolado de *M. anisopliae* teve maior esporulação no meio SDA ($25,13 \times 10^7$ conídios/mL), enquanto *M. robertsii* teve maior esporulação em BDA ($15,53 \times 10^7$ conídios/mL). Quanto à mortalidade de imaturos de *B. carambolae*, *M. anisopliae* foi superior a *M. robertsii* nos três substratos avaliados. Para *M. anisopliae* e *M. robertsii*, as maiores mortalidades ocorreram no substrato vermiculita, 54% e 30%, respectivamente. Os resultados indicaram diferenças tanto na esporulação quanto na patogenicidade dos isolados de *Metarhizium* contra imaturos de *B. carambolae*.

Palavras-chave: Produção de frutos, fungos entomopatogênicos, mosca-da-carambola.

ABSTRACT

One of the economically important insect species for the Brazilian fruit production is the carambola fruit fly (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock), quarantine pest restricted to the time the states of Amapá and Roraima. This pest causes direct damage to the fruits, elevates cost production, besides being considered a phytosanitary barrier to export fresh fruit. In Amapá, fruit production is carried out mostly by farmers and the presence of this pest makes it difficult to place marketing, affecting the generation of employment and income. The objective was evaluate the pathogenicity of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* spp. on immature *B. carambolae* under laboratory conditions. Soil samples were collected in the municipalities Oiapoque and Macapá and from these samples were isolated entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*. In the analysis of which culture medium species of *Metarhizium* are more sporulation, were tested means Potato-Dextrose-Agar (PDA), Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) and Malt-Extract-Agar (MEA or EMA). To verify mortality 3rd instar larvae of *B. carambolae*, solutions containing 1×10^7 conidia/mL of each isolate were used in treatments containing vermiculite, sterile and non-sterile soil. Data were submitted to analysis of variance and Tukey test at 5% probability by the statistical software "R". The isolate of *M. anisopliae* had highest number of spores in the mean SDA ($25,13 \times 10^7$ conidia/mL), while *M. robertsii* had higher sporulation in PDA ($15,53 \times 10^7$ conidia/mL). Regarding mortality of immature *B. carambolae*, *M. anisopliae* was higher than *M. robertsii* for all three substrates. *M. anisopliae* and *M. robertsii*, the highest mortality occurred in vermiculite, 54% and 30%, respectively. The results indicated differences in both sporulation and in pathogenicity of isolates of *Metarhizium* against immature *B. carambolae*.

Keywords: Fruit production, entomopathogenic fungi, carambola fruit fly.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de localização dos pontos de coleta de solo utilizado para obtenção dos isolados de <i>Metarhizium</i> no estado do Amapá.	17
Figura 2 - Isolados <i>Metarhizium anisopliae</i> (A) e <i>Metarhizium robertsii</i> (B).	19
Figura 3 - Meios de cultivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Sabouraud-Dextrose-Ágar (SDA) e Extrato de Malte-Ágar (EMA ou MEA) (A) e ensaio em B.O.D., após 28 dias de crescimento dos isolados <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium robertsii</i> (B).	20
Figura 4 - Suspensão de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizada para os tratamentos nos substratos vermiculita, solos estéril e não estéril.	22
Figura 5 - Ovos de <i>Bactrocera carambolae</i> sobre papel poroso em dieta artificial (A) e larvas de 3º instar de <i>Bactrocera carambolae</i> (B).	23
Figura 6 - Caixas gerbox contendo os diferentes substratos em câmara de crescimento do tipo B.O.D., sendo: (A) gerbox com solo e (B) gerbox com vermiculita.	23
Figura 7 - Cultivo de <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio Batata-Dextrose-Ágar (A), Sabouraud-Dextrose-Ágar (B) e Extrato de Malte-Ágar (C).	25
Figura 8 - Cultivo de <i>Metarhizium robertsii</i> em meio Batata-Dextrose-Ágar (A), Sabouraud-Dextrose-Ágar (B) e Extrato de Malte-Ágar (C).	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa dos meios de cultivo utilizados para os isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium robertsii</i>	19
Tabela 2 - Tratamentos com isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium robertsii</i> em diferentes substratos contra larvas de <i>Bactrocera carambolae</i>	21
Tabela 3 - Número de conídios ($\times 10^7$ /mL) produzidos por isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium robertsii</i> em três meios de cultivo.	26
Tabela 4 - Mortalidade (%) de imaturos de <i>Bactrocera carambolae</i> em diferentes substratos tratados com <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium robertsii</i>	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE EXÓTICA DE MOSCAS-DAS-FRUTAS <i>Bactrocera carambolae</i>	12
2.2 OPORTUNIDADES PARA UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Metarhizium</i> PARA O CONTROLE DE <i>Bactrocera carambolae</i>	13
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Metarhizium</i>	17
4.2 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Metarhizium</i>	18
4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Metarhizium</i>	18
4.4 DESENVOLVIMENTO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Metarhizium robertsii</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	19
4.5 CONTROLE DE IMATUROS DE <i>Bactrocera carambolae</i> POR <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Metarhizium robertsii</i>	20
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 DESENVOLVIMENTO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Metarhizium robertsii</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	25
5.2 MORTALIDADE DE IMATUROS DE <i>Bactrocera carambolae</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE) CAUSADA POR <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Metarhizium robertsii</i>	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira encontra-se em um de seus momentos mais dinâmicos, pois além da ampla variedade de espécies produzidas em todas as regiões do País, o aumento da produtividade, as formas de apresentação e de industrialização colocam as frutas em destaque no agronegócio brasileiro (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas com cerca de 45 milhões de toneladas/ano, das quais 65% são consumidas internamente e 35% são destinadas ao mercado externo. É uma atividade econômica que envolve mais de cinco milhões de pessoas que trabalham de forma direta e indireta nesse setor (EMBRAPA, 2015).

Na Amazônia, a fruticultura é uma alternativa viável para o desenvolvimento da agricultura. A região apresenta condições edafoclimáticas favoráveis à produção de frutas tropicais nativas e exóticas. Além disso, possui cerca de 58 milhões de hectares desmatados, onde a fruticultura poderia ser recomendada para a ocupação dessas áreas, contribuindo para a recuperação ambiental. Adicionalmente, a região apresenta localização privilegiada em relação aos países da América do Sul e da América Central, disponibilidade de mão de obra e abundantes recursos hídricos para irrigação (NASCENTE; NETO, 2005).

Nas últimas décadas, a produção de frutas na Amazônia passou por importantes transformações com a ascensão das frutas nativas, até então de consumo essencialmente regional. Apesar disso, ainda é preciso melhorar processos de produção, principalmente no que se refere à qualidade dos produtos, consolidação de agroindústrias, melhor organização de seus produtores e consolidação de uma melhor infraestrutura que possibilite melhores condições de competitividade (HOMMA; FRAZÃO, 2002; NASCENTE; NETO, 2005).

Particularmente no estado do Amapá, a atividade agrícola ainda é praticada em pequena escala e a participação no abastecimento do mercado local é pouco expressiva, não havendo excedente para exportação. Em função do baixo padrão tecnológico adotado, a qualidade e produtividade são baixas. Apesar disso, a fruticultura é uma opção de atividade agrícola, com tendência de expansão das áreas cultivadas, desde que o mercado seja viabilizado (PLANO/PPCDAP, 2009).

Apesar desse elevado potencial de crescimento da fruticultura na Amazônia, os problemas fitossanitários estão entre os mais importantes entraves ao desenvolvimento do setor, nesse contexto, as moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) se apresentam como um dos principais entraves (SILVA; LIMA; DEUS, 2013). Os impactos dessas pragas estão associados à danos causados pelas fêmeas que, ao depositarem seus ovos no interior dos

frutos para o desenvolvimento das larvas, acabam depreciando ou inviabilizando a comercialização. De forma indireta, a presença de determinadas espécies de moscas-das-frutas classificadas como quarentenárias pode gerar barreiras à exportação, impostas preventivamente por países importadores para evitar a introdução da praga em seus territórios (FOLLETT; NEVEN, 2006).

No Brasil, uma das espécies quarentenárias mais importantes é a mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock), detectada no país pela primeira vez em 1996, no município de Oiapoque, estado do Amapá (MALAVASI, 2001). Após a detecção oficial, *B. carambolae* foi caracterizada como praga quarentenária A2 (atualmente chamada “praga quarentenária presente”), por estar em área restrita e sob controle oficial. Pragas enquadradas nessa categoria apresentam características que, caso ocorra sua dispersão para regiões nas quais elas não ocorrem, podem causar impactos socioeconômicos e ambientais extremamente relevantes (GODOY et al., 2011). Atualmente, há registro dessa espécie nos estados do Amapá e Roraima (BRASIL, 2013).

O impacto negativo da introdução da mosca-da-carambola em outras regiões do país, a exemplo do Submédio São Francisco (Bahia/Pernambuco), importante pólo de produção de frutas para exportação, pode ter consequências desastrosas, principalmente do ponto de vista econômico (SILVA; SUMAN; SILVA, 1997). Também devem ser consideradas as implicações ambientais devido aos efeitos de medidas de controle, especialmente químicas, sobre os recursos naturais e organismos não alvo, interferência nas interações biológicas com espécies nativas e adaptação a outras espécies comerciais ainda não consideradas hospedeiras (SILVA; SUMAN; SILVA, 1997; NASCIMENTO; CARVALHO, 2000). Adicionalmente, implicações sociais são esperadas, pois a perda de mercados importadores poderá provocar consideráveis efeitos adversos nos níveis de emprego vinculados ao segmento.

Diante disso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou, ainda em 1996, o Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola (PNEMC), que objetiva erradicar a praga e salvaguardar a fruticultura brasileira. Atualmente, o controle da mosca-da-carambola é realizado por meio das técnicas: (i) aniquilação de machos, com blocos de fibra impregnados com metil-eugenol e o inseticida malation; (ii) iscas impregnadas com proteína hidrolisada e o inseticida malation; (iii) enterrio de frutos; e (iv) pulverização de inseticidas em pomares (GODOY et al., 2011).

Embora as técnicas utilizadas pelo PNEMC sejam efetivas no controle e erradicação de focos de *B. carambolae* ao longo dos últimos anos, é premente a busca por técnicas alternativas de controle menos impactantes ao meio ambiente, à saúde dos trabalhadores e à

qualidade dos produtos. Nesse sentido, o controle biológico apresenta-se como uma ferramenta importante a ser inserida em programas de manejo integrado de moscas-das-frutas, pois atuará na redução da densidade populacional da praga, no aumento das populações de inimigos naturais e diminuirá os efeitos ambientais advindos dos tratamentos químicos (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000).

Dentre os métodos biológicos, o emprego de fungos entomopatogênicos apresenta potencial promissor para o controle de moscas-das-frutas. Trata-se de microrganismos que vivem no solo e podem causar a mortalidade de formas imaturas de moscas-das-frutas, por meio da infecção de larvas de 3º instar e pupas (EKESI; MANIANIA; LUX, 2003; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2000). Estudos dessa natureza são inéditos no estado do Amapá e em futuro próximo podem auxiliar programas oficiais de controle de *B. carambolae* de maneira efetiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE EXÓTICA DE MOSCAS-DAS-FRUTAS *Bactrocera carambolae*

A mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock, 1994) é uma das espécies representantes do complexo *Bactrocera dorsalis*, conhecido popularmente como complexo das moscas-das-frutas-oriental (GODOY et al., 2011). Na América do Sul foi coletada originalmente em 1975, em Paramaribo, no Suriname. Somente 11 anos depois foi identificada e registrada oficialmente. Em 1989 foi detectada na Guiana Francesa, e, em 1996, no Brasil, em Oiapoque, Estado do Amapá. Acredita-se, que sua introdução e expansão na América do Sul foram devido ao incremento do deslocamento de pessoas e suprimentos durante os anos de 60 e 70, uma vez que a população do Suriname é originária da Indonésia, região de origem da mosca-da-carambola (MALAVASI, 2001; VAYSSIÈRES et al., 2007; GODOY et al., 2011).

Considerada praga de grande expressão econômica para países exportadores de frutas, especialmente em virtude de restrições quarentenárias impostas por países importadores que não possuem a praga em seus territórios, a mosca-da-carambola constitui-se em problema fitossanitário de extrema relevância para o país, já que sua simples presença em áreas de produção pode levar a perda de importantes mercados importadores (MALAVASI, 2001).

Ainda em relação ao impacto às exportações, a introdução da mosca-da-carambola em outras regiões do país, a exemplo do Submédio São Francisco, pode ter consequências desastrosas, principalmente do ponto de vista econômico e social (SILVA; SUMAN; SILVA, 1997). Adicionalmente aos prejuízos às exportações, a dispersão da mosca-da-carambola pelo território nacional também levará a perdas diretas relevantes, como aumento dos custos de produção, redução do valor comercial e menor tempo de prateleira dos frutos infestados.

Assim, a dispersão da mosca-da-carambola implicará não somente na possível redução na produção e produtividade das frutíferas hospedeiras, mas também na provável perda de mercados, ocasionando efeitos adversos consideráveis nos níveis de emprego gerados por esse segmento.

Além disso, os impactos ambientais precisam ser considerados. A expansão e estabelecimento de espécies exóticas, como é o caso da mosca-da-carambola, também são facilitados pela ausência de inimigos naturais e competidores diretos, os quais seriam responsáveis por manter a população da praga em níveis relativamente baixos (MALAVASI,

2001). Desta forma, a principal alternativa de controle é a utilização de inseticidas químicos que podem ter efeito sobre os recursos naturais e organismos não-alvo e interferência nas interações biológicas com espécies nativas (SILVA; SUMAN; SILVA, 1997; NASCIMENTO; CARVALHO, 2000).

Dentre as alternativas de controle de *B. carambolae* destaca-se a pulverização com iscas tóxicas e a técnica de aniquilação de machos (TAM) (GODOY et al., 2011). A TAM consiste em utilizar blocos de madeira aglomerada embebidos em solução de metil eugenol (paraferomônio atrativo para machos) e inseticida organofosforado, que são aplicados às plantas hospedeiras para atraírem e matarem os machos por ingestão da solução atrativo/inseticida.

Apesar da eficiência do método, os insetos podem desenvolver relativa resistência às moléculas químicas dos inseticidas (BROWN; PAINE, 1988). Esse fenômeno inclusive já foi registrado para populações de espécies do gênero *Bactrocera*, como *Bactrocera dorsalis* (Hendel) e *B. oleae* (Gmelin) (VONTAS et al., 2002; HSU et al., 2004). Em laboratório, também já foi registrado a ocorrência de *B. oleae* resistentes à isca tóxica à base de espinosade (KAKANI; LABEAUD; KING, 2010), produto derivado da fermentação da bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa*.

Diante da importância da praga quarentenária *B. carambolae*, iniciativas que contribuam para o seu efetivo controle são altamente desejáveis. Nesse contexto, se insere o controle biológico com fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium* sp. Essa estratégia considera principalmente a utilização desses agentes de controle biológico em pulverizações de solo, já que importantes fases do ciclo de vida (larvas de 3^o instar e pupas) desses insetos desenvolvem-se nesse ambiente, sob a projeção da copa de plantas hospedeiras.

2.2 OPORTUNIDADES PARA UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Metarhizium* PARA O CONTROLE DE *Bactrocera carambolae*

Em decorrência dos problemas reconhecidamente associados à utilização de inseticidas químicos para o controle de pragas agrícolas, é necessário, especialmente nos dias atuais, o desenvolvimento de alternativas efetivas a essa prática, sempre se tendo como premissa a necessidade de mantermos o equilíbrio do agroecossistema, principalmente se estivermos trabalhando em ambientes amazônicos.

Dentre as alternativas ao uso indiscriminado de inseticidas químicos podemos inserir o controle biológico. Essa estratégia, apesar de ainda subutilizada, pode se tornar um importante componente de programas de manejo integrado de pragas (MIP). Nesse contexto, o emprego de agentes fúngicos de controle biológico como *Metarhizium* spp. pode contribuir significativamente, já que apresenta comprovada eficácia de controle, facilidade de produção massal em diversos substratos, ampla adaptação à variadas condições ambientais e praticamente nenhum efeito deletério sobre o ambiente natural.

A estratégia de utilização de espécies do gênero *Metarhizium* se torna especialmente interessante para o controle de pragas agrícolas que desenvolvem parte de seu ciclo de vida no solo, como é o caso das moscas-das-frutas. Para esses insetos-praga o estágio de seu ciclo de vida que se desenvolve no solo (estágio de pupa) não é o responsável pelos danos causados aos frutos; no entanto, esse ambiente pode ser considerado altamente atrativo à liberação de agentes de controle biológico como *Metarhizium* spp., já que está menos sujeito a extremos de temperatura e umidade, principalmente. Além disso, como o solo é o habitat natural de espécies do gênero *Metarhizium*, esse ambiente deveria ser estrategicamente mais explorado por programas de controle biológico de insetos-praga que desenvolvem pelo menos parte de seu ciclo de vida no solo (EKESI; MANIANIA; LUX, 2002).

Outra vantagem associada à utilização de espécies de *Metarhizium* em tratamento de solo é a possibilidade de propagação horizontal e penetração no perfil do solo dos propágulos (conídios) do agente de controle biológico. Essa vantagem, restrita a tratamentos que utilizam organismos vivos, pode proporcionar o controle de larvas e pupas de mosca-das-frutas mesmo quando a aplicação inicial não propiciar o contato direto entre os propágulos do agente de controle biológico e o organismo-alvo, uma vez que, desenvolvidos com base em formulações adequadas e sob condições climáticas favoráveis, o microrganismo agente de controle biológico pode atingir profundidades de até 15 cm (STOREY; GARDNER, 1987).

Ainda no que diz respeito a persistência de agentes fúngicos de controle biológico no solo, é importante observar que esta normalmente está condicionada a utilização de formulações granuladas, as quais garantem relativa proteção do agente de controle contra microrganismos residentes e, principalmente, disponibilizam fonte adicional de nutrientes (DUKE et al., 1997; EKESI et al., 2005). Essa possibilidade do agente de controle biológico persistir no solo após sua introdução é de grande relevância prática, já que a amplitude do período de controle pode ser consideravelmente ampliada.

Trabalhos utilizando fungos entomopatogênicos, notadamente *M. anisopliae*, para o controle de moscas-das-frutas em condições tropicais tem atestado a real possibilidade de

utilização dessa tecnologia, cujos resultados podem atingir níveis até mesmo superiores aos obtidos com o tratamento químico, além de não afetar o desenvolvimento de parasitoides, os quais poderiam ser utilizados de maneira complementar em programas de controle de espécies de moscas-das-frutas (EKESI; MANIANIA; LUX, 2002; EKESI et al., 2005).

Trabalhos recentes demonstram a viabilidade de utilização de *Metarhizium* spp. para o controle da espécie de moscas-das-frutas do gênero *Bactrocera*. Nesse sentido, Yousef et al. (2013) evidenciaram a efetividade de *M. brunneum* para o controle de *B. oleae* em solo, chegando a alcançarem níveis de controle da ordem de até 82%. Em outro trabalho utilizando essa estratégia de controle biológico, Gul et al. (2015) testaram *M. anisopliae* para o controle de larvas e pupas de *B. zonata*. Nesse trabalho, além da redução da emergência de adultos ocasionada por *M. anisopliae*, também ficou evidenciado o efeito do agente de controle biológico na capacidade normal de emergência dos adultos.

Diante do exposto, é evidente que a estratégia de utilização de espécies de *Metarhizium* para o controle de moscas-das-frutas, incluindo *B. carambolae*, em condições de solo se mostra muito atrativa. Esta prática sugere a aplicação de *Metarhizium* spp. diretamente no solo, sob a projeção da copa das plantas hospedeiras, exatamente onde se localizam as larvas de 3º ínstar e pupas dessa espécie-praga.

Por fim, vale ressaltar que o sucesso de programas de controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos também está condicionado ao isolamento e seleção de isolados eficientes. Assim, a busca por organismos que estejam perfeitamente adaptados às condições ecológicas prevalentes, nas quais eles serão utilizados, é altamente desejável. Dessa forma, agentes fúngicos de controle biológico de *B. carambolae*, como *Metarhizium* spp., deverão ser isolados na mesma região de ocorrência da praga-alvo, uma vez que a tolerância do agente de controle a estresses climáticos parece estar correlacionada com sua origem geográfica (VIDAL; FARGUES; LACEY, 1997), já que, apesar de isolados de *M. anisopliae* provenientes de diferentes origens serem capazes de atacar insetos suscetíveis, eles também podem apresentar habilidades para tolerar condições ambientais altamente discrepantes (BIDOCHKA; LEGER; ROBERTS, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em laboratório a patogenicidade de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp. em imaturos de *Bactrocera carambolae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar em qual meio de cultivo a ação dos isolados *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* se torna mais eficiente quanto à esporulação;

Avaliar a ação dos isolados *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* na mortalidade de imaturos de *Bactrocera carambolae* em três diferentes substratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Metarhizium*

Os isolados de *Metarhizium* foram obtidos a partir de solo de pomares urbanos nos municípios de Oiapoque e Macapá, Estado do Amapá (Figura 1). As amostras de solo, de aproximadamente 1 kg, foram coletadas em abril de 2013. Para recuperação dos isolados, larvas de 3º instar de *B. carambolae* foram adicionadas a caixas gerbox contendo as respectivas amostras de solo para pupação. Posteriormente, as caixas gerbox foram transferidas para estufa do tipo B.O.D. e mantidas a temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$, sem fotoperíodo, por três dias. Após esse período, as pupas foram coletadas, desinfestadas superficialmente por 30 segundos com hipoclorito (1%) e transferidas para câmara úmida para induzir o crescimento de micro-organismos infectivos. Em câmara úmida, dois micro-organismos que cresceram sob as pupas de *B. carambolae* apresentaram características morfológicas compatíveis com o gênero *Metarhizium* (Isolados CPAFAP 3.8 e CPAFAP 14.8).

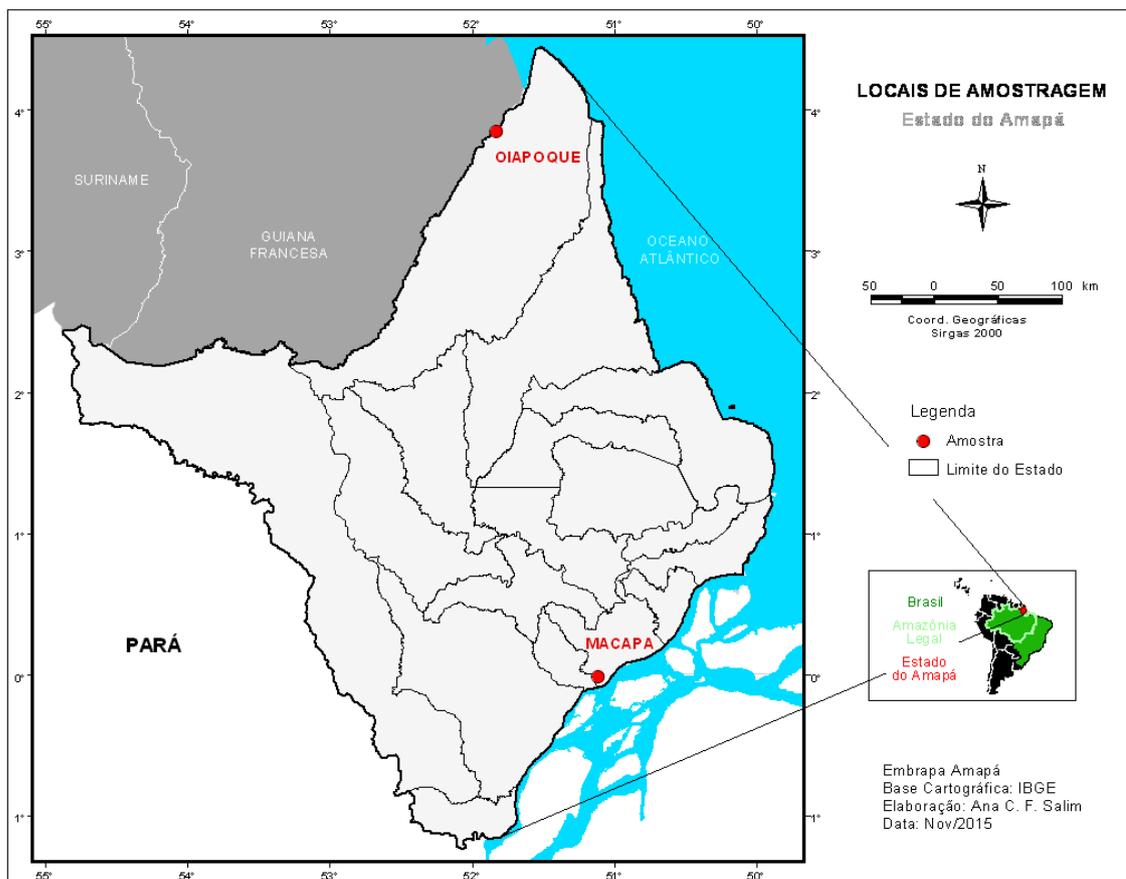


Figura 1 - Mapa de localização dos pontos de coleta de solo utilizado para obtenção dos isolados de *Metarhizium* no estado do Amapá.

Fonte: Ana C. F. Salim.

4.2 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Metarhizium*

Os isolados CPAFAP 3.8 e CPAFAP 14.8 passaram pelo processo de individualização de conídios por meio de técnica monospórica (GOETTEL; INGLIS, 1997), com a utilização de suspensão de conídios crescidos em meio de cultivo Extrato de Malte (EM). Essa suspensão foi analisada em câmara de Neubauer e sua concentração foi reduzida por diluição, adicionando-se 100 µL da solução mais concentrada em 900 µL de Água Destilada Esterilizada (ADE). Após o ajuste da melhor concentração de conídios, 100 µL da solução foram colocadas em placas de petri contendo meio de cultivo Ágar-água (AA).

As placas com AA foram incubadas em estufa do tipo B.O.D. a temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, sem fotoperíodo. Após 72 horas, operando sob microscópio ótico, em câmara de fluxo laminar, foram selecionados conídios isolados e em seguida transferidos para novas placas de petri contendo meio de cultivo EM, obtendo-se colônias purificadas.

Os trabalhos de isolamento e purificação dos isolados foram realizados nos laboratórios de Fitopatologia, Entomologia e Controle Biológico da Embrapa Amapá.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Metarhizium*

Após o processo de isolamento e purificação dos isolados, esses foram enviados para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF), para identificação com base na técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF) (LOPES et al., 2014). Os dois isolados morfológicamente compatíveis com *Metarhizium* foram identificados como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (sensu strictu) (Figura 2A) e *Metarhizium robertsii* (Figura 2B). As referidas espécies, além de estarem armazenadas na Embrapa Amapá, também estão preservadas nas formas liofilizada e criopreservada na Coleção de Fungos de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob os códigos CG1313 (*M. anisopliae*) e CG1314 (*M. robertsii*).

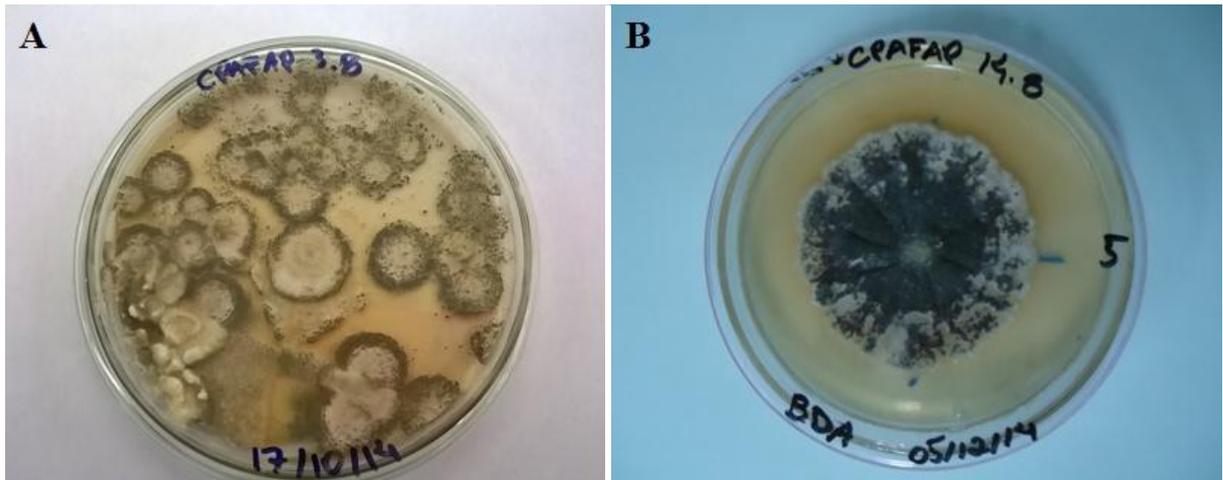


Figura 2 - Isolados *Metarhizium anisopliae* (A) e *Metarhizium robertsii* (B).
Fonte: Taline Silva.

4.4 DESENVOLVIMENTO DE *Metarhizium anisopliae* E *Metarhizium robertsii* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar em qual meio de cultivo os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* apresentam maior esporulação. Essa informação poderá ser importante posteriormente, caso haja necessidade de se produzir conídios em grande quantidade. Foram testados três meios de cultivo para verificação de esporulação dos isolados. Os meios utilizados foram Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Sabouraud-Dextrose-Ágar (SDA) e Extrato de Malte-Ágar (EMA ou MEA). A composição quali-quantitativa de cada meio de cultivo é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa dos meios de cultivo utilizados para os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*.

Meio de cultivo	Composição
Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	9,75g/250 mL AD*
Sabouraud-Dextrose-Ágar (SDA)	16,25g/250 mL AD*
Extrato de Malte-Ágar (EMA ou MEA)	5g EM + 5g Ágar / 250 mL AD*

*AD – Água Destilada

Para pesagem dos componentes dos meios de cultivo, utilizou-se balança analítica aferindo-se a quantidade para 250 mL de Água Destilada. Após o processo de autoclavagem dos meios (120°C por 20 minutos a 1 atm), esses foram resfriados até a temperatura de 45-

48°C para adição do antibiótico Azitromicina (100µg/mL). Após adição do antibiótico e ainda no estado líquido, os meios foram vertidos em placas de petri no interior de câmara de fluxo laminar. Para esse ensaio, cada tratamento foi composto por oito repetições.

Após o resfriamento do meio de cultivo no interior das placas, foi acrescentado 5 µL de suspensão com concentração de 1×10^7 conídios/mL no centro de cada placa. Posteriormente as placas foram seladas com parafilme e transferidas para câmara de crescimento do tipo B.O.D., a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sem fotoperíodo (Figura 3). Após 28 dias, os tratamentos foram avaliados quanto à esporulação, por meio da contagem de conídios em suspensão com auxílio de câmara de Neubauer (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2007).



Figura 3 - Meios de cultivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Sabouraud-Dextrose-Ágar (SDA) e Extrato de Malte-Ágar (EMA ou MEA) (A) e ensaio em B.O.D., após 28 dias de crescimento dos isolados *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* (B).

Fonte: Taline Silva.

4.5 CONTROLE DE IMATUROS DE *Bactrocera carambolae* POR *Metarhizium anisopliae* E *Metarhizium robertsii*

No presente ensaio foi verificado o potencial de *M. anisopliae* e *M. robertsii* para o controle de imaturos de *B. carambolae*. O estudo foi realizado em esquema fatorial, sendo os fatores constituídos por dois isolados de *Metarhizium* (*M. anisopliae* e *M. robertsii*) e três tipos de substratos (vermiculita, solo estéril e solo não estéril). Cada tratamento foi conduzido com 10 repetições, cada uma constituída por cinco larvas de 3º instar de *B. carambolae* (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos com isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* em diferentes substratos contra larvas de *Bactrocera carambolae*.

Isolados	Substratos	Repetições	Larvas por repetição	Larvas por tratamento
Testemunha	Vermiculita	10	5	50
	Solo estéril	10	5	50
	Solo não estéril	10	5	50
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Vermiculita	10	5	50
	Solo estéril	10	5	50
	Solo não estéril	10	5	50
<i>Metarhizium robertsii</i>	Vermiculita	10	5	50
	Solo estéril	10	5	50
	Solo não estéril	10	5	50

As suspensões de *M. anisopliae* e *M. robertsii* utilizadas nos tratamentos foram realizadas de acordo com metodologia adaptada de Ekesi, Maniania e Lux (2003). Foram utilizadas placas com meio de cultivo Sabouroud Dextrose Ágar para o crescimento do isolado *M. anisopliae* enquanto que para o isolado *M. robertsii* foi utilizado o meio de cultivo Batata Dextrose Ágar. Os entomopatógenos foram cultivados por 28 dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D. nas mesmas condições referidas anteriormente (Item 4.1). Após o período de crescimento, 15 mL de Água Destilada Esterilizada contendo 0,1% de TWEEN[®] 80 foi adicionado a cada placa. Todas as placas foram raspadas superficialmente para recuperação dos conídios e seus conteúdos foram combinados para formar uma única suspensão (Figura 4).

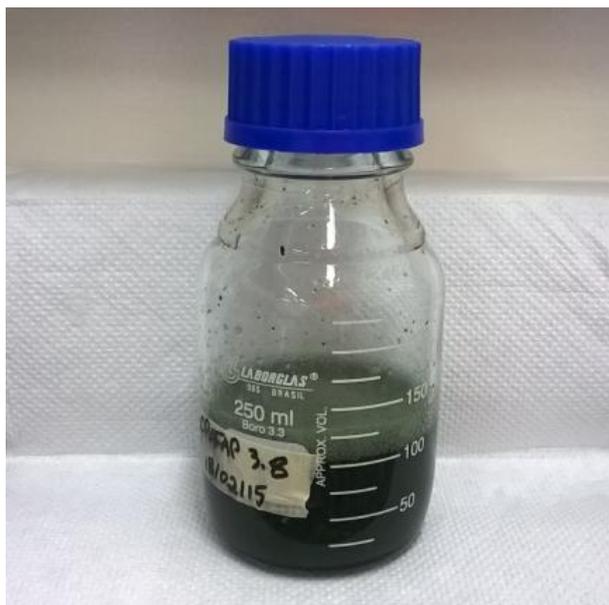


Figura 4 - Suspensão de conídios de *Metarhizium anisopliae* utilizada para os tratamentos nos substratos vermiculita, solos estéril e não estéril.

Fonte: Taline Silva

Após a obtenção das suspensões iniciais, os conídios foram contados em Câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 1×10^8 conídios/mL, obtendo-se assim a suspensão de trabalho. À suspensão de trabalho acrescentou-se 0,1% de TWEEN[®] 80 e 2% de espalhante adesivo (AGRAL[®]). A solução TWEEN[®], que é uma solução dispersante, foi acrescentada com o objetivo de diminuir a hidrofobia dos esporos e deixar a solução mais solúvel, enquanto que o espalhante adesivo AGRAL[®] foi acrescentado para melhorar a absorção e penetração da solução nas larvas. A solução utilizada para os tratamentos testemunha continha somente ADE adicionada de 0,1% de TWEEN[®] 80 e 2% de espalhante adesivo (AGRAL[®]).

O solo foi obtido a partir de pomar urbano na cidade de Macapá, Estado do Amapá. Previamente à utilização, o solo foi peneirado e parte foi autoclavado a 120°C, por 20 minutos, para compor os tratamentos de solo estéril. As quantidades de substratos utilizadas em cada repetição foram: 30 g para vermiculita e 160 g para solo estéril e não estéril. Os substratos foram colocados em caixas gerbox, formando uma camada de aproximadamente 1,5 cm, para que as larvas pudessem enterrar-se sem dificuldade para pupação.

As larvas utilizadas foram obtidas a partir de adultos de *B. carambolae* na segunda geração da criação de mosca-da-carambola da Embrapa Amapá. Os ovos foram coletados duas vezes por dia e colocados em dieta artificial (composta de 67g de bagaço de cana de

açúcar, 41,2g de farinha de soja, 41,2g de levedura, 41,2g de açúcar cristal, 8,5g de ácido cítrico, 1g de benzoato de sódio, 1,2g de nipagin e 298,7mL de água destilada) para o desenvolvimento das larvas até o 3º instar (Figura 5).

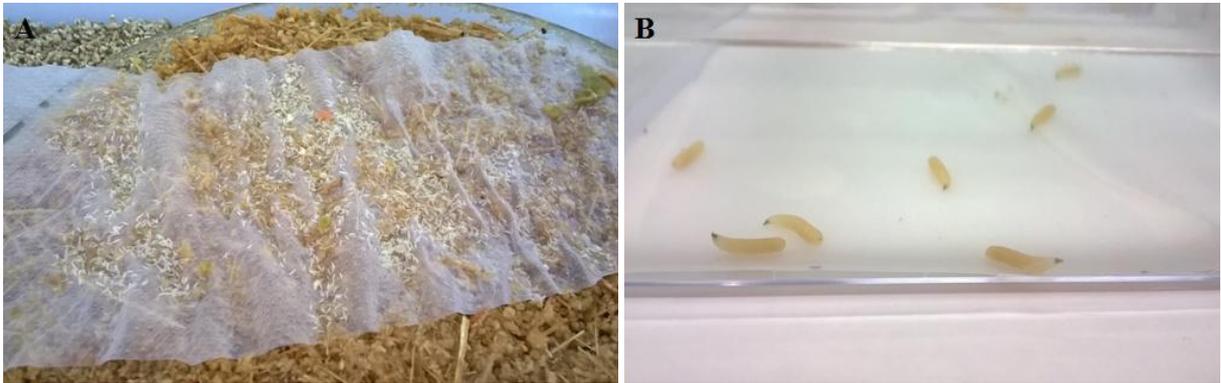


Figura 5 - Ovos de *Bactrocera carambolae* sobre papel poroso em dieta artificial (A) e larvas de 3º instar de *Bactrocera carambolae* (B).

Fonte: Taline Silva

As caixas gerbox contendo os diferentes substratos foram pulverizadas com as suspensões de conídios das duas espécies de *Metarhizium* e com a solução ADE especificadas anteriormente. Em seguida foram acrescentadas cinco larvas de 3º instar de *B. carambolae*. Posteriormente as caixas gerbox foram transferidas para câmara de crescimento do tipo B.O.D. nas mesmas condições descritas no item 4.1 (Figura 6). Diariamente as caixas gerbox foram umedecidas com ADE (adaptado de QUESADA-MORAGA; RUIZ-GARCÍA; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006).

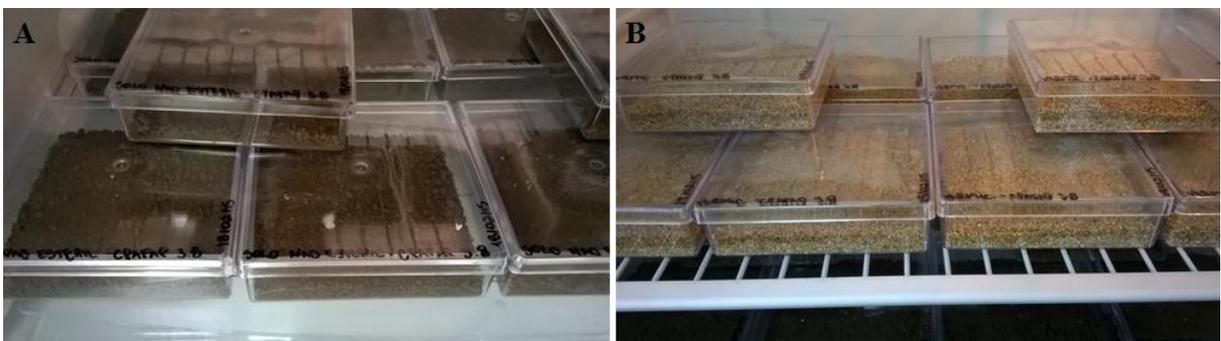


Figura 6 - Caixas gerbox contendo os diferentes substratos em câmara de crescimento do tipo B.O.D., sendo: (A) gerbox com solo e (B) gerbox com vermiculita.

Fonte: Taline Silva

Por fim, as avaliações foram realizadas com base na contagem do número de adultos de *B. carambolae* emergidos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados, os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos resíduos, e aos testes de Bartlett e de Levene, para verificar a homogeneidade entre as variâncias. Como os dados originais não atenderam a esses pressupostos, foram realizadas transformações adequadas a cada variável. Para porcentagem de mortalidade, usou-se a transformação arco seno da raiz quadrada e, para concentração de conídios, a transformação logarítmica. Em seguida, os dados foram submetidos à análise da variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico “R”.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DE *Metarhizium anisopliae* E *Metarhizium robertsii* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Houve efeito da interação entre os fatores isolados (*M. anisopliae* e *M. robertsii*) e meios de cultura (BDA, SDA e EMA), o que significa que os isolados esporulam de forma diferente em cada meio de cultivo (Figuras 7 e 8).

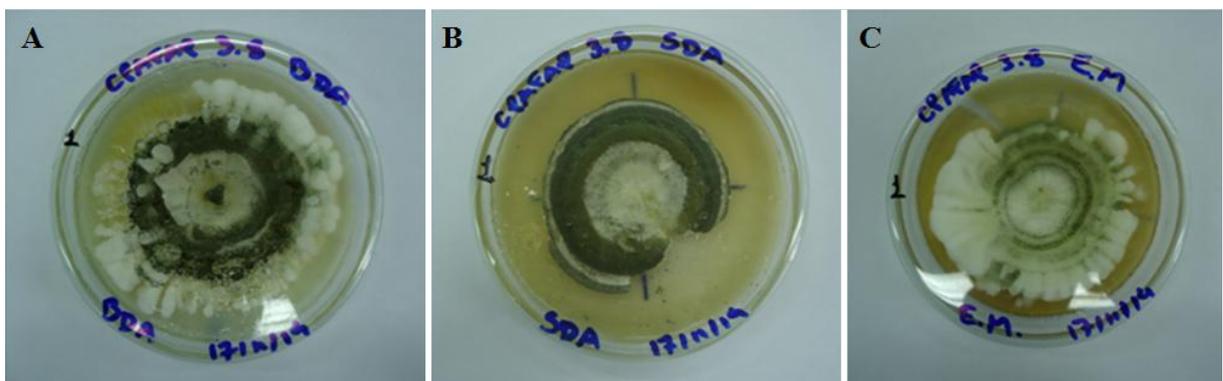


Figura 7 – Cultivo de *Metarhizium anisopliae* em meio Batata-Dextrose-Ágar (A), Sabouraud-Dextrose-Ágar (B) e Extrato de Malte-Ágar (C).

Fonte: Taline Silva

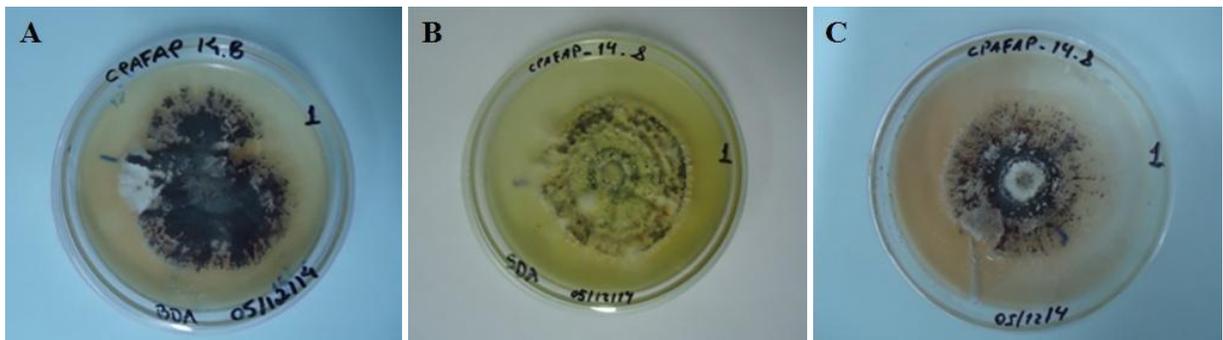


Figura 8 – Cultivo de *Metarhizium robertsii* em meio Batata-Dextrose-Ágar (A), Sabouraud-Dextrose-Ágar (B) e Extrato de Malte-Ágar (C).

Fonte: Taline Silva

O isolado de *M. anisopliae* apresentou maior esporulação média total no meio SDA ($25,13 \times 10^7$ conídios/mL), enquanto *M. robertsii* teve maior esporulação média total em BDA ($15,53 \times 10^7$ conídios/mL) (Tabela 3). Em meio SDA, *M. anisopliae* esporula aproximadamente três vezes mais que *M. robertsii* (Tabela 3). Ambos os isolados apresentaram baixa esporulação no meio EMA ($5,94 \times 10^7$ conídios/mL para *M. anisopliae* e

$5,34 \times 10^7$ conídios/mL para *M. robertsii*), indicando não ser um meio de cultivo adequado para a esporulação.

Tabela 3 - Número de conídios ($\times 10^7$ /mL) produzidos por isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* em três meios de cultivo.

Fungos	Meios de cultivo*		
	BDA**	SDA**	EMA**
<i>Metarhizium anisopliae</i>	11,94±2,82 bA	25,13±4,61 aA	5,94±0,64 cA
<i>Metarhizium robertsii</i>	15,53±1,57 aA	8,44±1,51 bB	5,34±0,39 bA

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. **BDA – Batata Dextrose Ágar; SDA – Sabouraud Dextrose Ágar; EMA – Extrato de Malte-Ágar.

Estudos que indiquem o melhor meio de cultivo para os isolados são incomuns, uma vez que para produção em larga escala, a forma mais usada de multiplicação de *Metarhizium* é através de cultivo em arroz. Porém, alguns estudos analisam a esporulação dos isolados em meios de cultivo interagindo com inseticidas ou outras substâncias, como o caso de alguns estudos que serão discutidos e onde poderemos comparar os dados apresentados (em relação ao controle/testemunha) com os resultados obtidos neste estudo.

Guaraná (2007) estudou a interação de um isolado de *M. anisopliae* com os inseticidas Confidor 700 GR (Imidaclopride), Decis 25 SC (Deltametrina), K-Othrine CE 25 (Deltametrina), Quimióleo (Azadiractina) e Sevin 480 SC (Carbaril). O fungo, cultivado a 28°C, em fotoperíodo de 12h, por 12 dias, em meio BDA, apresentou esporulação de $7,5 \times 10^7$ conídios/mL. Também avaliando a esporulação de dois isolados de *M. anisopliae* (URPE-6 e URPE-19) em contato com os inseticidas Neemseto (Nim), Pirate SC (Clorfenapir), Rumo WG (Indoxacarbe), Tracer SC (Espinosade) e Vertimec 18 CE (Abamectina), Santos (2008) obteve taxas de esporulação de $10,7 \times 10^7$ e $15,2 \times 10^7$ conídios/mL, respectivamente, sob condições de 27°C, em fotoperíodo de 12h, por 14 dias em meio BDA.

No presente trabalho, os isolados *M. anisopliae* e *M. robertsii* apresentaram $11,94 \times 10^7$ e $15,53 \times 10^7$ conídios/mL, respectivamente, em meio BDA. Esses resultados se aproximam dos obtidos por Guaraná (2007) e Santos (2008), detalhados acima.

Estudando as diferentes condições nutricionais de carbono e nitrogênio nos meios de cultivo frente à esporulação de *M. anisopliae* (CG312), Fernandes (2010) obteve esporulações que variaram de $8,1 \times 10^4$ conídios/mL em meio Sabouraud, até $4,45 \times 10^8$ conídios/mL em Batata Ágar Maltose. Os resultados obtidos em meio Sabouraud e meio Batata Ágar Maltose

são inferiores aos obtidos em nosso estudo, porém a esporulação obtida em meio BDA ($1,2 \times 10^8$ conídios/mL) foi muito semelhante à esporulação do isolado *M. anisopliae* de nosso estudo, com valor de $11,94 \times 10^7$ conídios/mL.

Jabor et al. (2003) avaliaram a esporulação de sete linhagens de *M. anisopliae* em Meio Completo (MC), meio Sabouraud (MS) e meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Apenas uma linhagem (Diplóide) esporulou melhor em MS. Três linhagens obtiveram maior esporulação em meio BDA e três em MC, sendo o meio BDA o que proporcionou as maiores esporulações frente aos outros meios. As linhagens obtiveram esporulação variando de $10,2 \times 10^5 \text{cm}^2$ a $280 \times 10^5 \text{cm}^2$ em MC, de $1 \times 10^5 \text{cm}^2$ a $265 \times 10^5 \text{cm}^2$ em MS e de $1,6 \times 10^5 \text{cm}^2$ a $346 \times 10^5 \text{cm}^2$ em meio BDA.

Onofre et al. (2001) estudando o efeito de três meios de cultivo, Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Czapek-Ágar (CZP) e Meio Completo (MC), e três regimes de luminosidade (claro contínuo, alternância com luz do dia/escuro e luz negra/escuro), sobre a esporulação de *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride*, obtiveram em meio BDA esporulações de $5,3 \times 10^6$ conídios/mL, 1×10^6 conídios/mL e 2×10^6 conídios/mL, respectivamente nos regimes de claro contínuo, luz negra/escuro e luz do dia/escuro. Em meio MC o isolado obteve esporulações de $3,4 \times 10^6$ conídios/mL, $2,8 \times 10^6$ conídios/mL e $2,4 \times 10^6$ conídios/mL nos regimes de claro contínuo, luz negra/escuro e luz do dia/escuro, respectivamente. Em meio CZP o isolado obteve esporulações de $2,9 \times 10^6$ conídios/mL, $1,7 \times 10^6$ conídios/mL e $1,7 \times 10^6$ conídios/mL nos regimes de claro contínuo, luz negra/escuro e luz do dia/escuro, respectivamente.

Os resultados obtidos por Jabor et al. (2003) e Onofre et al. (2001), mesmo os que apresentaram maior esporulação (346×10^5 e $5,3 \times 10^6$ conídios/mL), foram inferiores aos obtidos no presente trabalho para os isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii* nos três meios de cultivo avaliados. Essa inferioridade na esporulação pode estar relacionada com o tempo de crescimento dos isolados, tendo em vista que nos trabalhos citados o tempo de crescimento foi de 15 e 7 dias, respectivamente.

Por outro lado, Vieira et al. (2009) utilizaram o meio de cultivo BDA e diferentes temperaturas (25, 28, 30, 35, 40 e 45° C) para avaliar a esporulação de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, por 15 dias. As médias de esporulação de *M. anisopliae* var. *acridum* nas diferentes temperaturas foram: $2,5 \times 10^8$ conídios a 25°C; $2,9 \times 10^8$ conídios a 28°C; e $2,7 \times 10^8$ conídios a 30°C. Nas temperaturas de 35°, 40° e 45°C, a esporulação foi abaixo de $0,00 \times 10^8$ conídios. Comparando os resultados anteriores com os obtidos em nosso estudo, observamos uma inferioridade nas esporulações de *M. anisopliae* ($11,94 \times 10^7$ conídios/mL) e

M. robertsii ($15,53 \times 10^7$ conídios/mL) frente às observadas para *M. anisopliae* var. *acidum*, nas temperaturas de 25°, 28° e 30°C.

5.2 MORTALIDADE DE IMATUROS DE *Bactrocera carambolae* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) CAUSADA POR *Metarhizium anisopliae* E *Metarhizium robertsii*

Os resultados do presente estudo mostram que *M. anisopliae* foi superior a *M. robertsii* no que diz respeito à capacidade patogênica contra imaturos de *B. carambolae* nos três substratos avaliados. As maiores mortalidades obtidas foram de 54% e 36%, causadas por *M. anisopliae*, nos substratos vermiculita e solo estéril, respectivamente (Tabela 4). Ambas as mortalidades diferiram significativamente das proporcionadas por *M. robertsii* nos mesmos substratos. Curiosamente, *M. robertsii* ocasionou menor mortalidade que o tratamento testemunha em solo não estéril, porém essa diferença não foi significativa estatisticamente.

Tabela 4 - Mortalidade (%) de imaturos de *Bactrocera carambolae* em diferentes substratos tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*.

Fungos	Substratos		
	Vermiculita	Solo estéril	Solo não estéril
Testemunha	6,00±3,06 aC	10,00±2,98 aB	10,00±3,33 aA
<i>Metarhizium anisopliae</i>	54,00±6,00 aA	36,00±7,18 abA	20,00±7,30 bA
<i>Metarhizium robertsii</i>	30,00±6,15 aB	14,00±4,27 abB	4,00±2,67 bA

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nossos resultados foram inferiores aos obtidos por Yousef et al. (2013) em ensaio de controle de *Bactrocera oleae* com o fungo entomopatogênico *Metarhizium brunneum*. No referido trabalho o substrato (solo esterilizado) tratado com *M. brunneum* teve efeito significativo na sobrevivência de *B. oleae*, tendo em vista que 82,27% das larvas não chegaram ao estágio adulto, enquanto 35,45% das larvas atingiram o estágio adulto no tratamento testemunha. Por outro lado, observa-se que, mesmo no tratamento testemunha, a mortalidade dos imaturos foi elevada (35,45%), o que não ocorreu no presente trabalho, já que em solo estéril, apesar da mortalidade proporcionada por *M. anisopliae* ter sido de 36%, a mortalidade no tratamento testemunha foi de apenas 10% (Tabela 4).

Em outro ensaio, realizado por Gul et al. (2015), o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* também foi avaliado quanto ao potencial de controle de larvas e pupas de *Bactrocera zonata* em solo estéril. Nesse trabalho o entomopatógeno foi utilizado em três concentrações (1×10^8 , 2×10^8 e 3×10^8 conídios/mL). Na concentração de 1×10^8 conídios/mL a mortalidade dos adultos foi de 5%, enquanto nas concentrações de 2×10^8 e 3×10^8 conídios/mL a mortalidade foi um pouco inferior a 20%. Esses resultados são inferiores aos obtidos no presente estudo, uma vez que em solo estéril o tratamento que recebeu *M. anisopliae* resultou em 36% de mortalidade de adultos (Tabela 4). Além disso, deve-se considerar que a concentração de *M. anisopliae* utilizada em nosso estudo foi de apenas 1×10^8 conídios/mL.

Além de espécies do gênero *Bactrocera*, o entomopatógeno *M. anisopliae* também tem sido avaliado quanto à capacidade de infectar outras espécies de moscas-das-frutas, inclusive de outros gêneros (*Anastrepha* e *Ceratitis*). Em trabalho realizado por Destéfano et al. (2005), *M. anisopliae* foi testado para o controle de *Anastrepha fraterculus* em solo estéril e não estéril. Para o bioensaio foram utilizadas as concentrações de $2,52 \times 10^8$, $2,52 \times 10^9$ e $2,52 \times 10^{10}$ conídios/grama de solo. Para a concentração de $2,52 \times 10^9$ conídios/grama de solo a mortalidade dos adultos foi de 46% para o solo estéril e 40% para o solo não estéril. Na concentração de $2,52 \times 10^{10}$ conídios/grama de solo, a mortalidade dos adultos foi de 86%. É importante ressaltar que as concentrações utilizadas nesse estudo foram consideravelmente elevadas quando comparadas às utilizadas no presente trabalho. Além disso, os conídios, após aplicados, eram dispersados no solo, o que possivelmente contribuiu para a elevada eficiência de controle de *M. anisopliae*, especialmente na maior concentração ($2,52 \times 10^{10}$ conídios/grama de solo).

Em trabalho semelhante ao anterior, Lozano-Tovar et al. (2013) avaliaram o potencial de *M. brunneum* para o controle de *C. capitata* em solo. Nesse ensaio os autores obtiveram elevada mortalidade de imaturos (até 95%) nos tratamentos que receberam *M. brunneum*. No entanto, como no trabalho anterior, os conídios eram dispersados após a aplicação no solo. Isso certamente contribuiu para a melhor distribuição dos propágulos no perfil do solo e aumentou consideravelmente a possibilidade dos conídios entrarem em contato com os imaturos de *M. brunneum*, levando, conseqüentemente, a uma maior eficiência de controle por parte do entomopatógeno.

A infectividade de *M. anisopliae* sobre imaturos de *C. capitata* em solo também foi investigada por Garrido-Jurado et al. (2011). Nesse ensaio, a mortalidade pupal obtida nos tratamentos com *M. anisopliae* variaram entre 40% e 83,8%, enquanto nos tratamentos que não receberam o entomopatógeno a mortalidade variou entre 6,7% a 20%. Mais uma vez se

observa a alta mortalidade de imaturos de *C. capitata* ocasionada por *M. anisopliae*. Entretanto, novamente deve ser ressaltado que essa elevada mortalidade pode ser ocasionada pela metodologia de aplicação dos propágulos do entomopatógeno no solo, já que após a aplicação da suspensão de conídios, o solo é misturado para facilitar a dispersão desses propágulos em todo o perfil. Essa prática certamente aumenta a possibilidade dos conídios entrarem em contato com os imaturos de *C. capitata*, para iniciar o processo de infecção.

Lezama-Gutiérrez et al. (2000) em bioensaio de controle da *Anastrepha ludens* com *M. anisopliae* obtiveram mortalidade de 51% e 67% em solo arenoso e franco, respectivamente. Nesse mesmo trabalho, mortalidades de larvas de *A. ludens* entre 37,5% e 98,75% foram observadas. Esses valores possivelmente só foram obtidos porque as larvas foram imersas diretamente na suspensão de conídios por 30 segundos, o que certamente não é factível quando consideramos a possível utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de moscas-das-frutas na prática.

Metarhizium anisopliae também foi avaliado em quatro diferentes formulações para o controle de *Ceratitis capitata*, *C. fasciventris* e *C. cosyra* (EKESI et al., 2005). A taxa de mortalidade dos adultos variou entre 77% a 66% para *C. capitata*, 84% a 51% para *C. fasciventris* e 83% a 70% para *C. cosyra*. Nesse trabalho *M. anisopliae* apresentou elevada capacidade de controle das diferentes espécies de *Ceratitis*. Essa maior capacidade de controle pode ser parcialmente explicada pela eficiência das formulações. Nesse contexto, o desenvolvimento de formulações que ampliem o tempo de sobrevivência dos entomopatógenos e tornem seus propágulos (conídios) mais infectivos parece ser uma das maiores barreiras para o desenvolvimento efetivo do controle biológico de pragas agrícolas.

A compatibilidade de *M. brunneum* com diferentes herbicidas (Oxyfluorfen, Terbutylazine, Diflufenican, Glyphosate, Diflufenican + Glyphosate, e Glyphosate + Terbutylazine) visando ao controle de *C. capitata* foi analisada por Yousef, Quesada-Moraga e Garrido-Jurado (2015). Nesse trabalho, o tratamento que recebeu somente a suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL) proporcionou a mortalidade de 75%. Os três tratamentos que continham o herbicida glifosato mais *M. brunneum* foram significativamente diferentes do tratamento com somente o entomopatógeno, e significativamente iguais entre si (mortalidades que variaram entre 45% e 50%). Esse resultado sugere que o glifosato pode interferir na capacidade de entomopatógenos do gênero *Metarhizium* controlar moscas-das-frutas em solo. O tratamento que recebeu Oxyfluorfen mais *M. brunneum* ocasionou 80% de mortalidade de *C. capitata*, indicando que esse herbicida não interfere na capacidade de controle do entomopatógeno.

Em outro trabalho, *M. anisopliae* foi testado para o controle de *C. capitata* em solo não estéril com diferentes umidades e temperaturas (EKESI; MANIANIA; LUX, 2003). Os valores de mortalidade de adultos variaram entre 90% e 25%. Também foi verificado que a temperatura e umidade influenciam a mortalidade de *C. capitata*, visto que em maiores temperaturas e menores umidades ocorreu maior mortalidade. Essa constatação é importante quando se vislumbra o uso do controle biológico de moscas-das-frutas por *M. anisopliae* em regiões como o estado do Amapá, já que as diferenças na umidade do solo variam enormemente durante o período seco e chuvoso.

Quesada-Moraga, Ruiz-Garcia e Santiago-Álvarez (2006) também exploraram a capacidade de dois isolados de *M. anisopliae* (EAMa 01/58-Su e EAMa 01/121-Su) para o controle de *C. capitata* em diferentes umidades (-0,1Mpa, -0,01MPa e -0,0055Mpa). Ambos os isolados causaram maior mortalidade na umidade -0,1Mpa, comprovando que esse fator é fundamental para o sucesso do controle biológico com fungos entomopatogênicos.

Em estudo na mesma linha do trabalho anterior, Garrido-Jurado, Valverde-Garcia e Quesada-Moraga (2011) analisaram a influência de diferentes temperaturas e umidades na infectividade de *M. anisopliae* sobre *C. capitata*. A porcentagem máxima de pupários infectados foi de 64,3% a uma temperatura de 35°C e umidade de -0,23Mpa. Nesse estudo, mais uma vez ficou evidente a influência de fatores climáticos sobre a capacidade infectiva de *M. anisopliae*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho evidenciou o potencial de dois isolados regionais, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, para o controle da praga quarentenária *B. carambolae*. O status quarentenário da mosca-da-carambola é indiscutível sob o ponto de vista econômico, já que o simples registro dessa praga em áreas de exportação de frutas frescas, como o vale do São Francisco, pode ocasionar prejuízos irreparáveis à fruticultura brasileira no curto e médio prazo, devido ao fechamento dos mercados internacionais às frutas produzidas no Brasil.

Além disso, é igualmente importante considerarmos os custos ambientais associados à maior utilização de defensivos para o controle da praga em regiões onde ela não ocorria. Tanto as implicações econômicas quanto ambientais associadas à mosca-da-carambola justificam plenamente qualquer investimento em alternativas de manejo para essa praga. Adicionalmente, uma possível dispersão da praga poderia causar problemas sociais significativos, decorrentes da perda de inúmeros postos de trabalho.

Nesse contexto, ensaios visando à produção massal de inimigos naturais de pragas agrícolas são importantes. No presente trabalho ficou evidente o comportamento diferenciado dos dois isolados de *Metarhizium* quanto à capacidade de esporulação em diferentes meios de cultivo. Nossos resultados sugerem a utilização do meio de cultivo SDA para *M. anisopliae*, enquanto *M. robertsii* apresenta maior esporulação no meio de cultivo BDA.

Os resultados desse trabalho também mostraram diferenças na patogenicidade dos isolados de *Metarhizium* frente a imaturos de *B. carambolae* em diferentes substratos. *Metarhizium anisopliae* foi mais eficiente do que *M. robertsii* no controle dos imaturos, sugerindo o potencial de utilização desse isolado para o controle de imaturos da mosca-da-carambola diretamente no solo.

Finalmente, é importante observar que os resultados do presente trabalho não contemplaram a avaliação da mortalidade dos adultos de *B. carambolae* após a emergência. No entanto, observações preliminares em laboratório indicam que adultos emergidos de substratos tratados com os diferentes isolados de *Metarhizium* tiveram vida efêmera quando comparados com os adultos emergidos de substratos não tratados. Essa constatação indica que a mortalidade total (imaturos + adultos recém-emergidos) de *B. carambolae* pode ser significativamente superior à apresentada neste trabalho, o que tornaria o potencial dessa estratégia consideravelmente atrativa para inclusão em programa de controle integrado da mosca-da-carambola nas condições brasileiras.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. Produção, determinação e calibração da concentração de inoculo em suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 382 p. Viçosa: Ed. UFV, 2007. cap. 4, p.103-116.
- Anuário brasileiro de fruticultura** 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 104 p.
- BIDOCHKA, M. J.; St. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infection in grasshoppers and locusts: an overview. In: GOETTEL, M. S.; JOHNSOS, D. L. (Eds.). Microbial control of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**. v.171, p.213-224, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 59, de 18 de dez. de 2013. **Diário Oficial [da] União**, 19 dez. 2013. Seção 1, p. 91.
- BROWN, T. M.; PAYNE, G. T. Experimental selection for insecticide resistance. **Journal Economic Entomology**. v. 81, p. 49-56, 1988.
- CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R.; Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, p.113-117, 2000.
- DESTEFANO, R. H. R.; BECHARA, I. J.; MESSIAS, C. L.; PIEDRABUENA, A. E. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against immature stages of *Anastrepha fraterculus* fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Brazilian Journal of Microbiology** [online], v. 36, n.1, p. 94-99, ISSN 1678-4405, 2005.
- DUKE, G. M.; KANAGARATNAM, D. L.; JOHNSON, D. L.; GOETTEL, M. S. Persistence of *Beauveria bassiana* in soil following application of conidia through crop canopies. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.253-263, 1997.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 157–167, March, 2003.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Mortality in three African tephritidae fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v.12, p.7-17, 2002.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; MOHAMED, S. A.; LUX, S. A. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. **Biological Control**, v. 35, p. 83–91, 2005.
- EMBRAPA. Secretaria de Comunicação. **Embrapa em Números** / Embrapa, Secretaria de Comunicação. --- Brasília, DF: Embrapa, 138 p., 2015.
- FERNANDES, E. G. **Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): imunologia, interação patógenos-hospedeiro, fisiologia e controle biológico**. 2010. 134 p. Dissertação (Mestrado

em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

FOLLETT, P. A.; NEVEN, L. G. Current trends in quarantine entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 359-85, 2006.

GARRIDO-JURADO, I.; TORRENT, J.; BARRÓN, V.; CORPAS, A.; QUESADA-MORAGA, E. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 58, n. 3, p. 277-285, September, 2011.

GARRIDO-JURADO, I.; VALVERDE-GARCÍA, P.; QUESADA-MORAGA, E. Use of a multiple logistic regression model to determine the effects of soil moisture and temperature on the virulence of entomopathogenic fungi against pre-imaginal Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Biological Control**, v. 59, n. 3, p.366-372, December, 2011.

GODOY, M. J. S.; PACHECO, W. S. P.; PORTAL, R. R.; PIRES FILHO, J. M.; MORAES, L. M. M. Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola. In: SILVA, R. A.; LEMOS, W. P.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá. 300 p., 2011. cap. 8, p. 134-158.

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 213-249.

GUARANÁ, C. F. R. **Ação patogênica de linhagens de *Metarhizium anisopliae* sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), e compatibilidade química a inseticidas**. 2007. 102 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia). Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

GUL, H.T.; FREED, S.; AKMAL, M.; MALIK, M. N. Vulnerability of Different Life Stages of *Bactrocera zonata* (Tephritidae: Diptera) against Entomogenous Fungi. **Pakistan J. Zool.**, v. 47, n. 2, p. 307-317, 2015.

HOMMA, A. K. O.; FRAZÃO, D. A. C. O. O despertar da fruticultura amazônica. **Fruticultura em revista**, Belém, p. 16-2, nov. 2002. Edição especial do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura.

JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; RODRIGUES, S. B.; MARQUES-SILVA, G. G.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2003.

KAKANI, S.; LABEAUD, A. D.; KING, C. H. Planning for Rift Valley fever virus: use of geographical information systems to estimate the human health threat of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) - related transmission. **Geospatial Health**. v. 5, n. 1, p. 33–43, 2010.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; LUZ, A. T.; MOLINA-OCHOA, J.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; PESCADOR, A. R.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; ALUJA, M. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera:

Tephritidae): laboratory and field trials. **Journal of Economic Entomology**. v. 93, n. 4, p. 1080-1084, August, 2000.

LOPES, R. B.; FARIA, M.; SOUZA, D. A.; BLOCH JR., C.; SILVA, L. P. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, v. 106, n. 4, pp. 865–878, 2014.

LOZANO-TOVAR, M. D.; ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; TRAPERO-CASAS, A.; QUESADA-MORAGA, E. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. **Biological Control**, v. 67, p. 409–420, 2013.

MALAVASI, A. Mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 39-41.

NASCENTE, A. S.; NETO, C. R. **O agronegócio da fruticultura na Amazônia: um estudo exploratório**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2005.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S. Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 169-173.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *Flavoviride* on culture media and lighting regimes. Note. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 3, p. 613-616, jul./set., 2001.

PLANO de Prevenção e Controle do Desmatamento e Queimadas no Estado do Amapá - PPCDAP: contexto e ações. Macapá: Governo do Estado do Amapá. Secretaria Especial de Desenvolvimento Econômico. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 99 p., 2009.

QUESADA-MORAGA, E.; RUIZ-GARCÍA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 6, pp. 1955-1966, 2006.

SANTOS, L. M. P. **Efeito dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Soroke *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) e compatibilidade com inseticidas**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

SILVA, O. L. R.; SUMAN, R.; SILVA, J. R. **Mosca da carambola (*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock)**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Alerta quarentenário,1). 10 p., 1997.

SILVA, R. A.; LIMA, A. L.; DEUS, E. G. Controle biológico de moscas-das-frutas na Amazônia: um caminho para o desenvolvimento sustentável da fruticultura. **Inc. Soc.**, Brasília, DF, v. 6 n. 2, p.90-99, jan./jun. 2013.

STOREY, G. K.; GARDNER, W. A. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. **Environmental Entomology**, v.16, p.178-181, 1987.

VAYSSIÈRES, J. F.; CAYOL, J. P.; PERRIER, X.; MIDGARDEN, D. Impact of methyl eugenol e malathion bait stations on non target insect populations in French Guiana during an eradication program for *Bactrocera carambolae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 125, p. 55-62, 2007.

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

VIEIRA, P. D. S.; SILVA, W. M. T.; PAIVA, L. M.; ALVES-LIMA, E. A. L.; CAVALCANTI, V. L. B. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *Metarhizium anisopliae* Var. Acridum em diferentes temperaturas. **O Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p.43-47, jan./jun., 2009.

VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; NIKOU, D. C.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper. *Nilaparvata lugens*. **Biochemical journal**, 362, p. 329-337, 2002.

YOUSEF, M.; LOZANO-TOVAR, M. D.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its Extracts. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 3, p. 1118-1125, 2013.

YOUSEF, M.; QUESADA-MORAGA, E.; GARRIDO-JURADO, I. Compatibility of herbicides used in olive orchards with a *Metarhizium brunneum* strain used for the control of preimaginal stages of tephritids in the soil. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 3, p. 605-612, 2015.