

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCETIBILIDADE DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A ENTOMOPATÓGENOS**

Lucas Trevisoli Agostini

Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCETIBILIDADE DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A ENTOMOPATÓGENOS**

Lucas Trevisoli Agostini

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

2014

Agostini, Lucas Trevisoli

A

Suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera.: Noctuidae) a entomopatógenos / Lucas Trevisoli Agostini. – – Jaboticabal, 2014
v, 87 p. ; 28 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk

Banca examinadora: Italo Delalibera Júnior, Janete Aparecida Desidério

Bibliografia

1. Controle Biológico. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. *Metarhizium anisopliae*. 4. *Beauveria bassiana*. 5. *Metarhizium rileyi*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lucas Trevisoli Agostini - Nascido em 17 de Março de 1984, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, Brasil é graduado em Biologia pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), título obtido em março de 2010. Estagiou no Laboratório de Biossistemática e Criação Massal de Crisopídeos, onde desenvolveu projeto de iniciação científica com bolsa do CNPq durante a graduação. Durante a sua graduação teve a oportunidade de participar de eventos na área de Entomologia. No início de 2012 foi aprovado no Mestrado em Agronomia / Entomologia Agrícola pela UNESP - Campus de Jaboticabal, com início em Agosto de 2012 e término em Julho de 2014.

**“Em um lugar escuro nos encontramos, e um pouco mais de conhecimento
ilumina nosso caminho”**

Yoda

Aos meus amados pais Eliana de Fatima Trevisoli Agostini e José Guilherme Agostini, que dedicaram suas vidas ao sucesso de seus filhos, sendo meus grandes exemplos de conduta moral e afetiva.

Dedico

À minha amada Rafaela Jessica Gabriel, que com seu amor e dedicação tem sido minha base, inspiração e fonte de alegrias. Aos meus queridos irmãos Thiago Trevisoli Agostini e Matheus Trevisoli Agostini, que sempre abriram portas e auxiliaram incondicionalmente meus passos, além do convívio fraternal inesquecível.

Aos meus avós Maria Madalena Agostini, Anselmo Agostini (*in memoriam*), Natalina Longhi Trevisoli e Pedro Trevisoli Sobrinho, que são os responsáveis pela base sólida na educação.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e por todas as coisas boas que tem acontecido na minha vida.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista pela superior infraestrutura e oportunidade concedida.

Aos professores da Pós Graduação em Agronomia/Entomologia Agrícola, pelos conhecimentos passados e por serem responsáveis por mais um degrau alçado.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, que são indispensáveis para o correto andamento de tantos trabalhos, em especial à Lígia Dias Tostes Fiorezzi, pelos tantos auxílios prestados.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela orientação, ensinamentos e amizade.

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

À minha noiva Rafaela Jessica Gabriel por tantas ajudas e companheirismo.

Aos meus grandes amigos Rogerio Teixeira Duarte, Haroldo Xavier Linhares Volpe, João Rafael de Conte Carvalho de Alencar e Marina Aparecida Viana companheiros de pós-graduação que tanto me ensinaram, por não medir esforços para me ajudar, sempre! Pela paciência de ensinar e pelo companheirismo pela amizade e grande ajuda em todos os momentos.

Aos novos amigos feitos durante a pós-graduação: Maira Trevizan, Kelly Cristina Gonsalves, Ana Carolina Pires Veiga, Dagmara Gomes Ramalho, Vanessa Fabíola Carvalho, Natália Vieira, Wanderley Dibelli, Mariuci Romeiro Lopes, Gustavo Aparecido de Carvalho, Yasser Pagliusi Abrahão e Lais Fernanda Moreira. Que tanto me apoiaram e me auxiliaram nessa caminhada.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização dessa dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
Capítulo 1- Considerações Gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1 <i>Helicoverpa armigera</i>	3
2.1.1 Importância econômica.....	3
2.1.2 Biologia e morfologia.....	4
2.1.3 Ovo.....	5
2.1.4 Ínstares larvais.....	5
2.1.5 Pupa.....	6
2.1.6 Adulto.....	6
2.2 Controle microbiano.....	7
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.3.1 Histórico.....	8
2.3.2 Aspectos gerais.....	10
2.3.3 As toxinas e a atividade inseticida.....	11
2.3.4 α -exotoxina.....	11
2.3.5 β -exotoxina.....	12
2.3.6 Exoenzimas.....	12
2.3.7 Proteínas vegetativas inseticidas (VIP).....	13
2.3.8 δ -endotoxina.....	13
2.3.9 Modo de ação.....	14
2.3.10 Produtos comerciais: utilização e mercado.....	15
2.4 <i>Beauveria bassiana</i>	16

2.5 <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
2.6 <i>Metarhizium rileyi</i>	18
3. Referências bibliográficas.....	20
Capítulo 2 - Suscetibilidade de diferentes ínstares de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) à bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner.....	
1. Introdução.....	48
2. Resultados e discussão.....	49
2.1 Mortalidade de diferentes ínstares de <i>H. armigera</i> a bioinseticidas à base de Bt.....	50
3. Seção experimental.....	56
3.1 <i>H. armigera</i>	56
3.2 Patogenicidade de <i>B. thuringiensis</i> à <i>H. armigera</i>	57
3.3 Análise dos dados.....	58
4. Conclusão.....	58
5. Referências e notas.....	59
Capítulo 3 - Suscetibilidade de duas populações brasileiras de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) aos fungos entomopatogênicos <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium rileyi</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	
1. Introdução.....	65
2. Materiais e métodos.....	66
2.1 Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos.....	66
2.2 Efeito subletal.....	67
3. Resultados.....	68
3.1 Mortalidade de neonatas de <i>H. armigera</i> aos fungos entomopatogênicos <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium rileyi</i>	68
3.2 Efeitos subletais nos insetos provenientes da cidade de Rio Verde sobreviventes nos testes de patogenicidade.....	70
3.3 Efeitos subletais nos insetos provenientes da cidade de Luís Eduardo Magalhães sobreviventes nos testes de patogenicidade.....	71

4. Discussão.....	72
5. Conclusão.....	76
6. Referências bibliográficas.....	77

SUSCETIBILIDADE DE *Helicoverpa armigera* (Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A ENTOMOPATÓGENOS

RESUMO: A pesquisa objetivou analisar a suscetibilidade de duas populações distintas de *Helicoverpa armigera* a produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*. As populações foram coletadas em lavouras de soja nos municípios de Rio Verde (GO) e Luís Eduardo Magalhães (BA) e criadas em laboratório até a décima geração antes do início dos bioensaios. Os formulados utilizados foram Dipel[®] PM (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), Xentari[®] WG (*B. thuringiensis* var. *aizawai*) e Agree[®] WG (*B. thuringiensis* var. *aizawai* GC91 transconjugado com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), com a aplicação de 50 µL da suspensão do produto biológico, na concentração de 10⁷ esporos viáveis/mL, sobre a superfície da dieta acondicionada em recipientes esféricos de plástico (2 cm de diâmetro x 3 cm de altura). Em cada recipiente foi inserida uma lagarta, de cada instar larval, em um total de 100 lagartas por tratamento distribuídas em 10 repetições. As avaliações referentes à mortalidade foram efetuadas a cada 24 horas, até o sétimo dia após a aplicação dos tratamentos. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram obtidos a partir dos produtos comerciais biológicos Boveril[®] PM e Metarril[®] PM, respectivamente, enquanto que *M. rileyi* foi isolado de cadáveres de *H. armigera*, sendo padronizados na concentração de 10⁸ conídios viáveis/mL. Como unidade experimental foram utilizados recipientes de plástico (2 cm de diâmetro x 3 cm de altura), com dieta artificial na qual uma alíquota de 50 µL do fungo foi misturada ou aplicada na superfície. Em cada recipiente foi inserida uma lagarta de primeiro instar, com menos de 24 h de vida, totalizando 100 lagartas por tratamento distribuídas em 10 repetições. A mortalidade foi avaliada a cada 24 h, até o décimo dia após a aplicação dos tratamentos. Lagartas de primeiro instar de *H. armigera*, de ambas as populações e indiferente do produto biológico à base de *B. thuringiensis* utilizado, apresentaram elevada mortalidade quando comparada com os demais instares, variando entre 80 ± 4,22% e 88 ± 3,59%. Para a maioria dos tratamentos não houve diferença significativa quanto à mortalidade larval entre o segundo, terceiro e quarto instares. O quinto instar larval apresentou menor mortalidade dentro das duas populações, considerando os três produtos comerciais biológicos. Com relação à população de *H. armigera* coletada no município de Rio Verde, o fungo *M. rileyi* causou 56% de mortalidade em lagartas de primeiro instar, diferindo significativamente quando comparado com *B. bassiana*, com 34% de mortalidade. Para a população de Luís Eduardo Magalhães, a maior mortalidade de lagartas de *H. armigera* também foi observada para o tratamento com *M. rileyi*, porém não foi significativo em relação aos demais micro-organismos. As duas populações de *H. armigera* foram suscetíveis aos produtos biológicos a base de *Bt*, com maior mortalidade nos primeiros instares larvais. O fungo entomopatogênico *M. rileyi* ocasionou maior mortalidade em lagartas de primeiro instar de *H. armigera* quando comparado com os demais entomopatógenos, apresentando, porém, baixa eficiência de controle.

Palavras-Chave: Controle biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium rileyi*.

SUSCETIBILITY OF *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TO ENTOMOPATHOGENS

ABSTRACT: The research aimed to assess the susceptibility of two distinct Brazilian populations of *Helicoverpa armigera* to commercial *Bacillus thuringiensis* insecticides and isolates of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi*. The pest populations were collected in soybean fields located in Rio Verde (GO) and Luís Eduardo Magalhães (BA), taken to laboratory and reared until the tenth generation on artificial diet, to be used in the experiment. The bioassays were performed using spherical plastic receptacles (2-cm diameter x 3-cm height) containing artificial diet until complete the half volume. The formulated products used were Dipel[®] WP (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), Xentari[®] WG (*B. thuringiensis* var. *aizawai*) and Agree[®] WG (*B. thuringiensis* var. *aizawai* GC91 with *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), spraying 50 µL of biological product solution at 10⁷ viable spores/mL, on the surface of the diet. One caterpillar was inserted in each receptacle, related with larval instar, totaling 100 caterpillars per treatment and each group containing 10 caterpillars were considered a replication. Mortality were assessed each 24h, until the seventh day after the beginning of the bioassay. To perform the bioassays with entomopathogenic fungi, *B. bassiana* and *M. anisopliae* were obtained from the bio-insecticides Boveril[®] WP and Metaril[®] WP, respectively and *M. rileyi* was isolated from *H. armigera* cadavers at concentration of 10⁸ viable conidia/mL. The bioassays were performed using spherical plastic receptacles (2-cm diameter x 3-cm height) containing artificial diet until complete the half volume. After this step, a solution of 50 µL containing the entomopathogenic fungi was sprayed on the diet surface. One caterpillar was inserted in each receptacle, with less than 24 h after hatch, totaling 100 caterpillars per treatment. Each group containing 10 caterpillars were considered a replication. Mortality were assessed each 24h, until the tenth day after the beginning of the bioassay. First instar caterpillars from the two populations, independent of the Bt-based product showed high mortality when compared to the other instars, with a range between 80 ± 4,22% e 88 ± 3,59%. Most treatments did not show significant difference related to larval mortality to the second, third and fourth instars. The fifth instar showed the lowest mortality to the populations, considering the three commercial biological products. The two *H. armigera* populations were susceptible to the Bt-based insecticides, and the highest mortality was associated to the first instars. The entomopathogenic fungus *M. rileyi* caused highest mortality only to the first instar when compared to the other entomopathogens, however, showed the lowest efficiency when compared to the other microbial agents to the other instars.

Keywords: Biological Control, *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium rileyi*.

Capítulo 1 - Considerações gerais

1. Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie-praga responsável por grandes perdas econômicas em várias culturas (IGNACIMUTHU; JAYARAJ, 1982; SEKULIC et al., 2004; CHOUGULE et al., 2005), devido ao seu hábito polífago e ampla distribuição geográfica (ZALUCKI et al., 1986; GUO, 1997; GUOQING et al., 2001). Este inseto ainda não tinha sido encontrado no continente americano, porém a ocorrência desta espécie no Brasil foi relatada por Czepak et al. (2013).

As lagartas de *H. armigera* alimentam-se de folhas e caules das plantas, causando danos diretos e indiretos em mais de 100 espécies de plantas cultivadas e silvestres de 45 famílias, incluindo Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (FITT, 1989; ALI; POGUE, 2004; CHOUDHURY, 2009). No Brasil, esta espécie já foi encontrada alimentando-se de algodão, soja, milho, tomate, feijão, sorgo, milheto, guandu, trigo, crotalaria e plantas daninhas (ÁVILA et al., 2013).

No final de março de 2014, a Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo confirmou a ocorrência de *H. armigera* em quatro regiões: Avaré, Assis, São José do Rio Preto e Araraquara. Das 39 amostras obtidas, esta praga foi encontrada em 36 coletas (92%), incluindo as culturas da soja (11 municípios), milho (4 municípios), algodão (Itaí), amendoim e cana-de-açúcar (Mirassol), hortaliças e citros (Icem e Trabijú) e pastagens (São Carlos e Trabijú).

Os adultos de *H. armigera* são atraídos por flores que produzem néctar. Este recurso é essencial para a escolha do hospedeiro e influencia também a capacidade de oviposição da fêmea (CUNNINGHAM et al., 1999). Uma única fêmea é capaz de colocar entre 2.000 a 3.000 ovos, o que facilita a sua disseminação (NASERI et al., 2011).

Devido a sua alta capacidade de migração (ÁVILA et al., 2013; TAY et al., 2013), diferentes populações de *H. armigera* podem se formar devido ao isolamento geográfico, com conseqüente isolamento reprodutivo, originando populações fisiologicamente diferentes. Estas diferenças fisiológicas podem influenciar a

suscetibilidade às táticas de controle o que implicaria na necessidade de elaboração de sistemas de manejo de acordo com a variabilidade populacional. Essa variação de resposta pode ocorrer para entomopatógenos conforme observado para populações de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1759) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) provenientes de países da América Latina, Europa e de diferentes estados brasileiros (GONZÁLES-CABRERA et al., 2001; POLANCZYK et al., 2005; MONNERAT et al., 2006;).

A ausência de plantas resistentes e a falta de medidas de controle adequadas a *H. armigera* torna difícil controlar de forma satisfatória esse inseto no campo (CHOUGULE et al. 2005). Devido ao uso intenso de inseticidas populações desta praga tem desenvolvido resistência a vários piretróides e também a alguns novos inseticidas como fipronil, clorfenapir, indoxacarbe e spinosad (AHMAD et al., 2003; PATIL et. al., 2006; WU, 2007;). Em todo mundo populações de *H. armigera* são resistentes à 640 inseticidas (WYCKHUYS et. al., 2013), superando *P. xylostella*.

Os relatos de rápida evolução da resistência em populações desta espécie e o aumento da cobrança por parte do público consumidor pela produção de alimentos mais saudável e sustentável têm levado os agricultores a buscar medidas alternativas aos agrotóxicos convencionais. Entre estas, a utilização de agentes de controle microbiano de pragas, como é o caso da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (KARIM et al., 2000; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BOBROWSKI et al., 2003; POLANCZYK; ALVES 2003; BRAVO et al., 2011) A suscetibilidade de *H. armigera* a várias proteínas Cry de *Bt* foi relatada em muitos países nas últimas décadas (VAN FRANKENHYUZEN, 2009). Na Austrália, China e Índia as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry2Ab controlaram de maneira satisfatória *H. armigera* (LIAO et al., 2002).

Fungos entomopatogênicos têm grande potencial como agentes de controle de insetos-praga e são importantes táticas de controle de pragas em sistemas de manejo integrado de pragas (COATES et al., 2002; TONGMA, 2007; KAUR; PADMAJA, 2008; PENG et al., 2008; THUNGRABEAB). Diversos fungos entomopatogênicos, como *Lecanicillium* sp. (JUNG et al., 2006; OWNLEY et al., 2010), *Beauveria bassiana* (CHANDLER; DAVIDSON, 2005; QUESADA-MORAGA

et al., 2006) e *Metarhizium anisopliae* (SAHAYARAJ; FRANCIS BORGIO, 2010; DONG et al., 2007) são utilizados para controlar hemípteros, lepidópteros e coleópteros, sendo que o último foi relatado como eficaz contra *H. armigera* (WANG; LEGER, 2006).

A rapidez com que populações de *H. armigera* tornam-se resistentes à inseticidas (WYCKHUYS et al., 2013) e a grande capacidade de migração dos adultos que varia entre 1.000 a 2.000 km (ÁVILA et al., 2013; TAY et al., 2013) torna imprescindível a realização de estudos voltados ao manejo desta praga.

O manejo de *H. armigera* no Brasil ainda se encontra em fase inicial, sendo importante avaliar a suscetibilidade de *H. armigera* a agentes de controle microbiano também considerando a possível variabilidade populacional. Desta forma este trabalho teve como objetivo verificar a suscetibilidade de duas populações de *H. armigera* a produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* e isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Helicoverpa armigera*

2.1.1. Importância econômica

H. armigera está presente em toda a Europa, África, Ásia, Oceania e na América do Sul, em áreas de clima tropical e temperado (GUO, 1997; GUOQING et al., 2001; LAMMERS; MACLEOD, 2007; OEPP, 2008). O comércio internacional de plantas ornamentais é um dos principais fatores que contribui para a disseminação desse inseto-praga (CABI; OEPP, 1992; LAMMERS; MACLEOD, 2007).

H. armigera alimenta-se de cerca de 180 espécies de plantas pertencentes a 45 famílias sejam elas cultivadas ou não, incluindo Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (PAWAR et al., 1986; FITT, 1989; POGUE, 2004; SRIVASTAVA et al., 2005; ALI; CHOUDHURY, 2009). As lagartas são extremamente polífagas, causando danos a diversas culturas em todo mundo como

algodão, legumes, grão de bico, feijão, guandu, milheto, sorgo, milho, girassol, amendoim.

Na Europa *H. armigera* causa redução na produção entre 28-40%, o que resulta em perdas econômicas de US\$ 300 milhões/ano (NAZRUSSALAM; AHMAD; ALI, 2007; SHARMA et al., 2012;). Na Espanha, *H. armigera* é considerada uma praga devastadora nos cultivos de tomate (ARNÓ et al., 1999). A perda mundial causada por lagartas de *H. armigera* é estimada em US\$ 5 bilhões (LAMMERS; MACLEOD, 2007). A perda anual causada por *H. armigera* supera 2 bilhões de dólares apenas na região dos trópicos semiáridos da Europa e que o custo anual da aplicação de inseticidas nas lavouras, para o controle dessa praga, é de 500 milhões de dólares (SHARMA et al., 2008).

Em uma infestação uma única lagarta pode destruir de 30 a 40 vagens de grão-de-bico por planta (ALI et al., 2009). Araújo (1990) discorreu sobre os fatores que contribuem para a importância econômica de *H. armigera*, altamente polífaga; alta taxa de fertilidade dos ovos; elevada capacidade de migração auxiliada pelo vento, consomem caules, folhas, frutos e sementes das plantas, e o uso abusivo de inseticidas leva à eliminação dos seus inimigos naturais.

Nas Américas, essa praga não havia sido detectada até 2013, quando sua ocorrência foi registrada em várias regiões agrícolas do Brasil (CZEPAK et al., 2013). No Brasil, lagartas de *H. armigera* já foram constatadas se alimentando de várias culturas de importância econômica, tais como algodão, soja, milho, tomate, feijão, sorgo, milheto, guandú, trigo e crotalária, bem como em algumas espécies de plantas daninhas. Devido a sua capacidade de dispersão e condições climáticas favoráveis do Brasil existe a possibilidade de que *H. armigera* já esteja disseminada por todo o País (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

2.1.2. Biologia e morfologia

H. armigera tem atividade crepuscular e, por isso, a maioria da sua atividade é realizada durante a noite, permanecendo em repouso durante o dia (HARDWICK, 1965; FERREIRA, 1989; ARAÚJO, 1990). *H. armigera* é fortemente condicionada pela temperatura, umidade do ar e fotoperíodo e, por isso, o número de gerações

varia conforme o ano e o local. As condições ideais para o seu desenvolvimento são temperatura de 25°C, com intervalo entre 15°C e 35°C, umidade relativa de 90% e fotoperíodo de 16 horas (HARDWICK, 1965; ARAÚJO, 1990; MARTINS, 1990). Em condições ambientais adversas o inseto na fase de pupa, pode entrar em diapausa como forma de garantir a sua sobrevivência (MARTINS, 1990).

H. armigera é um inseto de metamorfose completa, ou seja, holometábolo, em que o seu desenvolvimento biológico passa pelas fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulta.

2.1.3. Ovo

O ovo apresenta um diâmetro de 0,5 mm, forma oval, mais aguda na parte apical e um achatado na base, a porção apical do ovo é lisa, porém o restante da sua superfície é esculpida em forma de nervuras longitudinais. A postura é de coloração branco-amarelada com aspecto brilhante logo após a sua deposição no substrato, tornando-se marrom-escuro próximo do momento de eclosão da larva (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013), que apresenta uma faixa castanho a partir do segundo dia (NASREEN; MUSTAFA, 2000).

Os primeiros ovos são normalmente inférteis e após três dias começam a ficar amarelos (NASREEN; MUSTAFA, 2000) Cada fêmea pode ovipositar entre 2.000 até 3.000 ovos. O tempo que decorre até à primeira postura pode demorar entre dois a quatro dias a 25°C (FIGUEIREDO et al., 2006). O período de incubação dos ovos é, em média, de 3,3 dias. As fêmeas realizam a oviposição de forma isolada ou em pequenos agrupamentos preferencialmente na face adaxial das folhas ou sobre os talos, flores, frutos e brotações terminais com superfícies pubescentes (MENSAH, 1996).

2.1.4. Instares larvais

H. armigera apresenta de cinco a seis instares larvais, sendo que a existência do 6º instar depende de fatores como características genéticas, condições climáticas e qualidade da alimentação (ARAÚJO, 1990).

O primeiro ínstar dura aproximadamente dois dias e a lagarta apresenta linhas longitudinais de cor amarelada, cápsula cefálica e pernas de coloração escura. No segundo ínstar as lagartas apresentam coloração marfim com um ponto dorsal preto no centro do terceiro segmento, este ínstar também apresenta duração aproximada de dois dias. As lagartas destes primeiros ínstares alimentam-se inicialmente das partes mais tenras das plantas, onde podem produzir um tipo de teia ou até mesmo formar um pequeno casulo (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

A partir do terceiro ínstar larval a cor da lagarta é variável, oscilando do amarelo-palha ao verde, com listras de coloração marrom laterais ao tórax, abdômen e na cabeça dependendo do tipo de alimento (ARAÚJO, 1990; ALI; CHOUDHURY, 2009). A partir do quarto ínstar, as lagartas apresentam tubérculos abdominais escuros e bem visíveis na região dorsal do primeiro esta característica determinante para a identificação de lagartas de *H. armigera* (MATTHEWS, 1999). O período larval dura entre 15 e 17 dias, aumentando a cada ínstar (FERREIRA, 1989; FIGUEIREDO et al., 2006).

2.1.5. Pupa

No final do último ínstar larval, a lagarta cessa sua alimentação e desloca-se para o solo procurando condições de umidade e temperatura adequadas. A lagarta então, tritura o substrato em que se encontra e com uma “rede” de fios de seda, confecciona uma proteção externa, um casulo e transforma-se em pupa. A pupa apresenta coloração verde-claro no início, e após um tempo o tegumento fica rígido, apresentando então uma cor castanha. Nesta fase é possível distinguir o sexo através da observação da genitália externa (ARAÚJO, 1990). A pupa de *H. armigera* é do tipo obtecta, apresentando um formato fusiforme com a superfície arredondada nas partes terminais. Este estágio dura entre 10 a 14 dias e as dimensões variam entre 12 a 20 mm (ALI; CHOUDHURY, 2009).

2.1.6. Adulto

Adultos de *H. armigera* apresentam dimorfismo sexual, podendo a fêmea e o macho ser diferenciados pela cor e tamanho das asas. Na fêmea, as asas apresentam um tom base castanho rosado e uma envergadura aproximada de 40 mm, enquanto nos machos as asas apresentam uma cor verde acinzentada e cerca de 35 mm de envergadura. Outra diferença visível é o formato do abdômen, sendo o da fêmea mais arredondada (JAYARAJ, 1972). Em ambos os sexos, as asas anteriores possuem uma mancha reniforme clara e na margem externa uma linha de sete a oito pontos escuros. As asas posteriores são brancas, com uma larga banda distal preta que contém uma mancha branca.

As fêmeas apresentam longevidade média de 11,7 dias; ligeiramente maior do que nos machos (9,2 dias) (ALI; CHOUDHURY, 2009). Os adultos de *H. armigera* são fortemente atraídos por flores que produzem néctar, sendo esse recurso importante na seleção do hospedeiro e influencia a sua capacidade de oviposição (CUNNINGHAM et al., 1999). Cada fêmea, durante o período de oviposição, que é de cerca de 5,3 dias, pode colocar de 2.000 até 3.000 ovos (REED, 1965; NASERI et al., 2011), o que caracteriza o elevado potencial reprodutivo desta espécie.

2.2. Controle microbiano

A utilização de micro-organismos para o controle biológico de pragas e insetos vetores foi inicialmente proposta no século 19, com as observações da epizootia de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin em bicho da seda, *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Esta contatação impulsionou o uso de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas, no entanto, a produção destes agentes de controle microbiano em grande escala é bem mais recente (STARNES et al., 1993; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Os principais microrganismos entomopatogênicos são fungos, bactérias, vírus e nematoides entomopatogênicos, com muitos exemplos de sucesso em utilização comercial como *Metarhizium anisopliae* (Metchinikoff, 1879) Sorokin 1883 para o controle de cigarrinhas de pastagem e da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae), *Bacillus thuringiensis* para lepidópteros desfolhadores em grandes culturas como o milho e algodão (MARTINS et al., 2007), nematoides para o controle de moscas-

das-frutas (ALMEIDA et al., 2007) e vírus da poliedrose nuclear (*Baculovirus anticarsia*) para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) (ALLEN; KNELL, 1977; SZEWCZYK et al., 2006).

Os micro-organismos entomopatogênicos são vantajosos no controle de pragas devido a especificidade e a seletividade, possuem a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, efeitos secundários que podem afetar as gerações seguintes, podem ser empregado juntamente com inseticidas seletivos, podem sofrer modificações genéticas em laboratório, a facilidade de multiplicação e dispersão, a produção em meios artificiais e a ausência ou redução de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não-alvo (TANADA; KAYA, 1993; ALVES, 1998).

2.3. *Bacillus thuringiensis*

2.3.1. Histórico

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria formadora de esporo gram-positiva aeróbica pertencente à família Bacillaceae, isolada pela primeira vez em 1901 em *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), pelo pesquisador japonês Shigetane Ishiwata, que a nomeou "Sottokin-Bacillus" (ISHIWATA, 1901; STEINHAUS, 1961; HEIMPEL; ANGUS, 1963). Posteriormente em 1915 esta bactéria foi redescoberta pelo biólogo alemão Ernst Berliner, que a isolou de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) (BERLINER, 1915).

Berliner mencionou a existência de cristais em culturas esporuladas de *Bt*, mas a atividade inseticida deste cristal só foi descoberta tempos depois (SANCHIS, BOURGUET, 2011). Hannay (1953) foi o primeiro pesquisador a relacionar os cristais, chamados pelo mesmo de corpos parasporais, com a patogenicidade de *Bt*, devido à possível formação de uma substância tóxica que causava a morte dos insetos, o que foi comprovado por Angus (1968).

As primeiras tentativas de usar *Bt* para o controle de insetos ocorreu no final de 1920 visando ao controle de *Lymantria dispar* (Linnaeus) (Lepidoptera: Erebidae) no nordeste dos Estados Unidos (METALNIKOV, CHORINE, 1929) e contra a broca

européia do milho, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae), na Hungria (HUSZ, 1930) e em outros países da Europa oriental (METALNIKOV et al., 1930). Em 1938, o primeiro produto comercial a base de *Bt* chamado Sporéine, foi produzido na França pelo Laboratoire Libec para o controle de lagartas da traça da farinha (LAMBERT; PEFEROEN, 1992; ENTWISTLE et al., 1993; RAMOS, 2008).

Os progressos no desenvolvimento de bioinseticidas à base de *Bt* foram interrompidos com a descoberta, em 1939, pelo químico suíço Paul Muller, das propriedades inseticidas do DDT e pelo início da Segunda Guerra Mundial. A Segunda Guerra Mundial uma série de avanços na indústria química e cientistas alemães sintetizaram o inseticida organofosforado parathion, o que reduziu ainda mais o interesse no uso de patógenos de insetos.

A utilização de *Bt* como bioinseticida aumentou no início de 1950, nos Estados Unidos, principalmente para o controle de lepidópteros (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). O ressurgimento do interesse em *Bt* pode ser atribuído a Edward Steinhaus, que iniciou testes com bactérias entomopatogênicas (STEINHAUS, 1951). Apesar dos ensaios em campo produzirem resultados inconsistentes, suas conclusões foram otimistas.

Em 1956, Steinhaus convenceu o presidente de uma empresa da Califórnia a produzir um produto à base de *Bt* nos Estados Unidos. Os testes iniciais com o bioinseticida denominado iniciaram em 1958. Outros produtos à base de *Bt* também foram desenvolvidos em grande escala na década de 1950 em vários outros países, incluindo a União Soviética, Alemanha e França (SANCHIS, 2011).

Em 1964, "Biospor" tornou-se o primeiro inseticida à base de *Bt* licenciado na Alemanha (SANCHIS, 2011). No entanto, apesar desses avanços, o *Bt* permaneceu apenas um componente menor de manejo de pragas, pois inseticidas sintéticos altamente eficientes foram sempre prontamente disponíveis.

Em 1970, Dulmage isolou uma potente estirpe de *Bt* de lagartas de *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae), e designou como cepa HD-1 (DULMAGE, 1970). Esta cepa tornou-se a base para produtos que eram competitivos com inseticidas químicos em termos de desempenho e custo. Esta cepa se tornou comercialmente disponível através Abbott Laboratories como Dipel®.

Após poucos anos havia vários produtos para o controle de lagartas da ordem Lepidoptera.

O uso de *Bt* se intensificou com a descoberta do *B. thuringiensis israelensis*, ativo contra dípteros e utilizado no controle de insetos vetores de doenças, principalmente dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium*. Em 1983, foi descoberto o *B. thuringiensis tenebrionis*, utilizado para controlar larvas de Coleoptera (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

O início da utilização de produtos a base de *Bt* no cenário agrícola brasileiro foi na década de 1960, com incremento significativo na pesquisa e utilização a partir de então (CAPALBO et al., 2008). Porém, até a década de 1990, apenas três produtos comerciais estavam disponíveis no mercado, o Dipel®, Thuricide® e o Bactospeine® (HABIB; ANDRADE, 1991).

Em 2010 bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* representaram 53% de todos os bioinseticidas comercializados mundialmente (CPL BUSINESS CONSULTANTS, 2010), e o produto Dipel® (*Bt kurstaki* HD-1) é o que mais se destaca no mercado mundial, pois, embora não seja tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente para 170 lepidópteros-pragas (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

2.3.2. Aspectos gerais

B. thuringiensis é uma bactéria da família *Bacillaceae*, gram e catalase positiva, aeróbia, podendo também crescer em anaerobiose entre 10 e 45°C (HABIB; ANDRADE, 1998; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; MONNERAT; BRAVO, 2000); é quimio heterotrófica, cuja temperatura ideal de crescimento é em torno de 30 ± 2°C (MORAES; CAPALBO, 1986). Suas células vegetativas possuem forma de bastonete, medindo cerca de 1,0 a 2,0 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento. Na célula ocorre a formação de esporos entre elípticos e cilíndricos, em posição central, com um esporângio não nitidamente estendido (HABIB; ANDRADE, 1998; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). Esta bactéria pode ser encontrada em diferentes regiões do mundo e em diversos substratos como solo, água, insetos mortos e superfície de algumas plantas (HÖFTE; WHITELEY, 1989;

BRAVO et al., 1998; VALICENTE; BARRETO, 2003; BIZZARRI; BISHOP, 2007; HERNÁNDEZ et al., 2005).

O ciclo de vida desse entomopatógeno pode ser dividido em duas fases principais, sendo uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria se multiplica por bipartição, e outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporos. Quando o esporo se encontra em um ambiente favorável ao seu crescimento, com nutrientes e temperatura adequados, pode germinar e iniciar o crescimento vegetativo (MONNERAT; PRAÇA, 2006).

A atividade tóxica desta bactéria está relacionada, principalmente, à produção de inclusões cristalinas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry na fase estacionária e que se acumulam na célula mãe durante a esporulação (YAMAMOTO; DEAN, 2000). Estas inclusões cristalinas podem conter uma ou mais proteínas Cry e cada toxina é codificada por um gene *cry* específico (LI; CARROL; ELLAR, 1991).

2.3.3. As toxinas e a atividade inseticida

Uma das características mais interessantes de toxinas Cry é sua especificidade determinada pela ligação específica das toxinas Cry à superfície proteicas localizadas nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio (BRAVO, 2011)

As toxinas Cry são classificadas pela sua sequência primária de aminoácidos e mais de 700 diferentes sequências de genes *cry* foram classificadas em 73 grupos (*cry1* ao *cry73*) (CRICKMORE et al., 2014).

Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* produz também outras toxinas com atividade inseticida, que podem aumentar a toxicidade das δ -endotoxinas, como a α -exotoxina, a β -exotoxina, as hemolisinas, as exoenzimas e as proteínas inseticidas vegetativas (VIPs) (HOFTE; WHITELEY, 1989; HABIB; ANDRADE, 1998). Os esporos também podem contribuir com a patogenicidade da bactéria pela ação sinérgica junto às proteínas Cry (JOHNSON; MCGAUGHEY, 1996).

2.3.4. α -exotoxina

Também conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfolipase, a α -exotoxina é uma enzima com atividade citolítica que age sobre os fosfolípidos presentes nas membranas celulares. É termolábil, solúvel em água, sendo altamente tóxica para alguns insetos e também para vertebrados, causando degeneração e lise das células. Pode ser encontrada no sobrenadante de algumas culturas, durante a fase logarítmica de crescimento de certas estirpes da bactéria, e atua causando a degeneração e a lise de hemócitos (HABIB; ANDRADE, 1998; HANSEN; SALAMITOU, 2000).

2.3.5. β -exotoxina

É produzida por certas estirpes de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura; pode ser chamada também de Thuringiensina. É termolábil, com baixa massa molecular. Existem dois tipos de β -exotoxinas, conhecidas como tipo I e tipo II (FARKAS et al., 1969).

A toxina tipo I é análoga ao ATP, composta por adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico (FARKAS et al., 1969). Sua atividade tóxica está relacionada com a inibição da RNA polimerase através da competição com ATP, apresentando um amplo espectro de toxicidade para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, provocando efeitos teratogênicos e mutagênicos (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

A tipo II é análoga de UTP e é mais tóxica que a do tipo I, principalmente para coleópteros (LEVINSON et al., 1990). Por ser extremamente tóxica a mamíferos, para a produção comercial deve-se selecionar estirpes de *B. thuringiensis* que não produzam essa toxina (McCLINTOCK et al., 1995).

2.3.6. Exoenzimas

Exoenzimas como as quitinases e as proteases são produzidas por *B. thuringiensis* e também estão relacionadas com a patogenicidade a insetos. Essas exoenzimas são liberadas pela bactéria e provocam a ruptura da membrana

peritrófica favorecendo o acesso das δ -endotoxinas ao epitélio intestinal (REDDY et al., 1998; SAMPSON; GOODAY, 1998).

2.3.7. Proteínas vegetativas inseticidas (VIP)

As proteínas VIPs (“vegetative insecticidal proteins”) são produzidas por algumas estirpes de *Bt* durante a fase vegetativa de crescimento e de esporulação (ESTRUCH et al., 1996). Por serem secretadas, não formarem inclusões cristalinas e por não apresentarem homologia de sequência ou de estrutura, as VIPs foram excluídas da nomenclatura das proteínas Cry (SCHNEPF et al., 1998).

Essas proteínas são patogênicas a insetos pouco sensíveis à maioria das proteínas Cry como *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae). O modo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, sabe-se que a VIP3A se une às células epiteliais do intestino médio do inseto provocando a lise celular. As manifestações tóxicas são semelhantes às que ocorrem com as proteínas Cry (YU et al., 1997).

2.3.8. δ -endotoxina

Em condições nutricionais desfavoráveis, *Bt* interrompe a divisão celular e dá início ao processo de esporulação. Durante a fase de esporulação, ocorre a produção das δ -endotoxinas ou proteínas Cry. As δ -endotoxinas se acumulam no compartimento da célula-mãe e, no final da esporulação, o cristal é liberado juntamente com o esporo. Existem dois tipos de δ -endotoxinas: as proteínas Cry e as Cyt. O espectro de ação das δ -endotoxinas é normalmente restrito a determinadas ordens de insetos (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera), nematóides e ácaros (HABIB; ANDRADE, 1998; SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al, 2007).

Essa bactéria pode produzir uma ou mais proteínas Cry com massa molecular variando de 40 a 140 kDa (SERAFINI et al., 2002). A forma do cristal é determinada

pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo variar de bipiramidal, cubóide, ovóide, esférica ou até mesmo não possuir forma definida (HABIB; ANDRADE, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003).

As proteínas Cyt não apresentam homologia com as proteínas Cry e possuem atividade citolítica, apresentando afinidade para ácidos graxos insaturados na porção lipídica da membrana celular (THOMAS; ELLAR, 1983). As proteínas Cyt são constituídas pelos grupos Cyt1 e Cyt2, sendo que as Cyt1 são: Cyt1Aa, Cyt1Ab e Cyt1Ba (THIERY et al., 1997), já as Cyt2: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca. Apresentam massa molecular de 27 – 30 kDa e toxicidade para insetos da ordem Diptera. Além disso, a proteína Cyt2Ca apresenta também atividade contra coleópteros (CRICKMORE et al., 1998).

2.3.9. Modo de ação

O modo de ação das proteínas Cry envolve diversas etapas, ingestão do complexo esporo-cristal pela larva suscetível, solubilização e processamento da toxina, ligação ao receptor, inserção na membrana, formação do poro e citólise. As proteínas Cry apresentam-se na forma de pró-toxinas e precisam ser ativadas por proteases para liberarem fragmentos tóxicos (SCHNEPF et al., 1998; MONNERAT; BRAVO, 2000).

Para a solubilização da pró-toxina ela deve entrar em contato com o pH alcalino do intestino médio das larvas dos insetos suscetíveis (KNOWLES, 1994). Diferenças na solubilização podem contribuir para determinar as alterações no grau de toxicidade entre as proteínas Cry (ARONSON et al., 1991).

Após a solubilização, é necessário o processamento das pró-toxinas por proteases presentes no intestino médio do inseto, para que ocorra a liberação do fragmento tóxico (TOJO; AIZAWA, 1983). A clivagem proteolítica é um fator importante que pode contribuir para determinar a especificidade; a principal protease digestiva de Lepidoptera e Diptera é a serino-protease, enquanto que para Coleoptera são principalmente cisteíno e aspártico-proteases (DE MAAGD et al., 2001). Alguns autores sugerem que o mecanismo de resistência desenvolvido no inseto pode estar relacionado com a redução de solubilidade e proteases envolvidas

(ARONSON et al., 1991; CHANG et al., 2012; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2012).

Após serem ativadas, as proteínas Cry se unem a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio das larvas de insetos suscetíveis, sendo um fator importante para a toxicidade e especificidade, determinando o espectro de ação das δ -endotoxinas (MONNERAT; BRAVO, 2000; DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2007). Ocorre então a formação de poros que propiciam o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele (COPPING; MENN, 2000; PRAÇA et al., 2004).

Os sintomas de intoxicação nos insetos são: param de se alimentar, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e posterior septicemia, levando o inseto à morte (GUPTA et al., 1985; BRAVO et al., 1992; MONNERAT; BRAVO, 2000).

2.3.10. Produtos comerciais: utilização e mercado

B. thuringiensis é utilizado no controle biológico de pragas há mais de 70 anos e suas vantagens são: ação específica sobre o inseto-alvo, inócuo ao meio ambiente mamíferos e vertebrados (MONNERAT; BRAVO, 2000; RAMOS, 2008). No mercado de bioinseticidas, os produtos a base dessa bactéria são os mais utilizados (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BRAR et al., 2006) e representam 53% de todos os bioinseticidas vendidos mundialmente (CPL BUSINESS CONSULTANTS, 2010).

Apesar disso, esses produtos nunca se destacaram nas vendas de inseticidas, principalmente por problemas relacionados à perda de estabilidade, ao espectro limitado de ação e à degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (NAVON, 2000).

O mercado de bioinseticidas em geral, incluindo botânicos, semioquímicos e macro-organismos, representa 2,5% do mercado mundial de inseticidas. Estima-se que, as vendas desses produtos a base de bactérias, vírus, fungos, protozoários e nematoides alcançaram US\$ 396 milhões em 2007/8 sendo que, desse total, os a base de *B. thuringiensis* correspondem a US\$ 210,79 milhões (CPL BUSINESS CONSULTANTS, 2010).

2.4. *Beauveria bassiana*

Dentre os agentes biológicos de controle de insetos, os fungos causam grande parte das doenças (Alves, 1998). A eficiência dos fungos é devida a grande biodiversidade em diversos ecossistemas o que torna possível a obtenção de isolados mais virulentos com objetivo de desenvolver agentes de controle biológico competitivos e inócuos ao meio ambiente (THOMAS, READ, 2007)

Beauveria bassiana é um fungo generalista que é hospedeiro natural do solo, e infecta diversas ordens de insetos (ZIMMERMANN, 2007). *B. bassiana* pode ser isolado de amostras de solo cultivado ou não cultivado, como florestas (BIDOCHKA et al., 1998). *B. bassiana* está inserido na ordem dos Hypocreales e na família Clavicipitaceae (FERNANDES et al., 2006), sendo conhecido vulgarmente como o fungo da muscardine branca devido sua coloração que pode variar do branco até o amarelo claro.

A importância deste fungo no controle microbiano de insetos vem desde o início da história da patologia de insetos, iniciando com as observações feitas em manifestações de fungos em criação de *B. mori*, até na proporção da sua utilização para o controle de diversos artrópodes como insetos e ácaros (FERRON, 1978). A dispersão de *B. bassiana* por insetos tem sido explorada no manejo de pragas usando a estratégia de auto-propagação (MEADOW et al., 2000; DOWD, VEGA, 2003; VICKERS et al., 2004).

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* é uma conhecida estratégia comercial para o controle biológico de importantes pragas da agricultura e de insetos vetores de doenças animais e humanas (FAN et al., 2011). A ocorrência natural de *B. bassiana* foi documentada em mais de 700 espécies de hospedeiros (INGLIS et al., 2001). Estudos sobre a prevalência de fungos em insetos têm sido geralmente limitados a espécies que são pragas ou são importantes espécies não-alvo, tais como certos predadores e parasitóides (MEYLING, EILENBERG, 2007).

O modo de ação de *B. bassiana* é através do contato, onde o fungo em contato com o tegumento do inseto e na presença de umidade e temperatura adequadas emite o apressório; estrutura de penetração que pode entrar em contato com os espiráculos, ou ainda degradar o exoesqueleto para, posteriormente

colonizar o inseto, crescer e se multiplicar. No entanto, pode ocorrer também a ingestão de conídios, que são a estrutura reprodutiva de *B. bassiana* e a colonização se inicia de dentro para fora, o que é uma condição mais atípica (SHAH & PELL, 2003).

O grande potencial de controle deste fungo entomopatogênico está comprovado em vários trabalhos que exploram o uso em diversas ordens de insetos como Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (MEYLING & EINLENBERG, 2007).

2.5. *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium é um dos gêneros de fungos entomopatogênicos mais conhecido e abundante em amostras de solo (LOMER et al., 2001; ROBERTS, ST. LEGER, 2004). É pertencente à família Moniliaceae da ordem Moniliales. Foi identificado pela primeira vez por Metschnikoff, em 1879, em *Anisopliae austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae). Estes fungos caracterizam-se por atacar um grande número de espécies de insetos (ZIMMERMANN, 1993).

A classificação de *Metarhizium* é baseada em caracteres morfológicos e a taxonomia do gênero *Metarhizium* foi recentemente revista (BISCHOFF et al., 2009). Sendo que as espécies desse gênero são potenciais agentes de controle microbiano de pragas (DRIVER et al., 2000).

A descoberta de que este fungo pode ser encontrado em raízes de diversas plantas, onde pode atuar como bioinseticida aumentou o interesse na utilização deste fungo como agente de controle biológico (LEGER, 2008). *M. anisopliae* apresenta um metabolismo extremamente versátil, permitindo o crescimento em várias condições ambientais, com nutrientes esparsos e na presença de compostos letais para outros fungos (ROBERTS, LEGER, 2004).

Metarhizium cresce vegetativamente como micélio produzindo hifas e conídios, que são os propágulos em artrópodes hospedeiros e em meios de cultura. Embora a gama de hospedeiros geral de *M. anisopliae* seja ampla, algumas estirpes podem ser hospedeiras específicas (SCHRANKA, VAINSTEIN, 2010). *M. anisopliae* infecta hospedeiros suscetíveis via penetração direta através da cutícula. As etapas do processo de infecção são: adesão dos conídios à cutícula do hospedeiro através

de interações hidrofóbicas e de material mucilaginoso fino; a germinação e o desenvolvimento dos conídios; a diferenciação de tubo germinativo em apressórios; a penetração da cutícula; a diferenciação de hifas em blastósporos e presença de hifas na hemolinfa; a colonização do hospedeiro; extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro e a formação de conidióforos e produção dos conídios (CHARNLEY, 2003; SCHRANKA, VAINSTEIN, 2010).

No Brasil *M. anisopliae* tem sido utilizado principalmente para o controle de pragas, como a cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854)(HEMIPTERA: CERCOPIDAE) na cultura da cana-de-açúcar e pastagens (ALVES et al. 2008).

2.6. *Metarhizium rileyi*

O fungo entomopatogênico *Metharhizium rileyi* (Farlow) (Kepler, Humber, Bischoff, Rehner), foi originalmente descrito como *Botrytis rileyi* (Farlow) e mais tarde como *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, depois sendo redescrito por Kish et al. (1974) e transferida para o gênero *Nomuraea*. Em 2014, Kepler et al. reclassificaram o fungo como *Metharhizium rileyi*.

M. rileyi é um fungo patogênico dimórfico que ao contrário dos entomopatógenos generalistas como, *B. bassiana* e *M. anisopliae*, é um fungo especialista que infecta apenas larvas de lepidópteros com preferência para espécies dentro da família Noctuideae (SUWANNAKUT; BOUCIAS; WIWAT, 2005). Este fungo é exigente em termos nutricionais, possui uma gama de hospedeiros estreita e não tem uma fase saprofítica no solo (BOUCIAS et al., 2000). Em todo o mundo, este fungo provoca epizootias em diversas populações das principais pragas que infestam sistemas agrícolas (IGNOFFO, 1981). Mais de trinta espécies de lepidópteros foram identificados como susceptíveis a *M. rileyi* (SUJII; CARVALHO; TIGANO, 2002).

M. rileyi é exigente em termos de fonte de carbono, bem como uma boa aeração e umidade para melhor esporulação (DEVI; PRASAD, 2000). Para germinar e penetrar no corpo do inseto a temperatura ideal é de 20 ± 25 °C (BOUCIAS et al, 1984; GARDNER, 1985; CARRUTHERS et al, 1985; MCDONALD, RICHARD, 1995). A elevada umidade também é essencial para o esporo se anexar a cutícula

(GETZIN, 1961, ALLEN et al., 1971, IGNOFFO et al, 1977;. HAJEK et al, 1990). Além disso, a sobrevivência dos esporos e viabilidade após armazenagem são influenciados pela umidade (DAOUST; ROBERTS, 1983;. IGNOFFO et al, 1985). A esporulação do fungo em cadáveres de insetos também requer alta umidade.

Em condições ambientais adequadas, *M. rileyi* reduziu drasticamente as populações de noctuídeos pragas nos Estados Unidos, México, Equador, Brasil, Argentina, Índia e Austrália (CARNER, 1980; CORRÊA; SMITH, 1975; FARIA et al., 1993; DEVI et al, 2003). Em alguns sistemas agrícolas subtropicais e temperadas, este entomopatógeno provoca uma mortalidade superior a 90% (BOUCIAS et al., 2000). A eficácia do fungo *M. rileyi* tem sido relatado contra *Helicoverpa armigera* em culturas de soja e algodão (TANG; HOU, 2001; HEGDE et al., 2004; RAMEGOWDA, 2005).

3. Referências bibliográficas

AHMAD M, IQBAL A M, AHMAD Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. **Crop Protection**, v.22, p.539-544, 2003

ALLEN, G. E.; GREENE, G. L.; WHITCOMB, W. H. Na epizootic *Spicaria rileyi* in the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* in Florida. **Florida Entomologist**, v. 54, p. 189-191, 1971.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. *Tunisian Journal of Plant Protection*, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009

ALLEN, G. E .; KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. **Florida Entomologist**, Florida, v.60, p.233-240, 1977

ALMEIDA J. E. M.; FILHO, A. B.; OLIVEIRA, F. C.; RAGA A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi and nematode on medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Bio-Assay**, Piracicaba, v. 2, n. 7, p.1-7, 2007

ANGUS, T. A. The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. **World Review of Pest Control**, Cambridge, v. 7, p. 1-26, 1968.

ARAÚJO, A. C. **Luta biológica contra *Heliothis armigera* no ecossistema agrícola “tomate de indústria”**. 1990 Dissertação para o Grau de Doutor em Entomologia, Universidade de Évora, Évora, 1990.

ARNÓ, J.; GABARRA, R.; ROIG, J.; FOSCH, T. Integrated pest management for processing tomatoes in the Ebro Delta (Spain). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 487, n. 1, p. 207-212, 1999.

ARONSON, A. I.; HAN, E.; MCGAUGHEY, W.; JOHNSON, D. The solubility of the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factoring toxicity to insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 12, p. 981–986, 1991.

ÁVILA, J. C.; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V.; **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n. 4, p. 587-616, 1992.

BERGVINSON, D., GARCIA-LARA, S. Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 480-485, 2004.

BERLINER, E. Eber die schlafsucht der Mehlmottenraupe. (*Ephesia kuehniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Z. ang. **Entomology**, v. 2, p. 29-56, 1915

BIDOCHKA, M. J., KASPERSKI, J. E., WILD, G. A. M. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 1198–1204, 1998.

BISCHOFF, JOSEPH F., STEPHEN A. REHNER, AND RICHARD A. HUMBER. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.

BIZZARRI, M. F.; BISHOP, A. H. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 94, n. 1, p. 38-47, 2007

BOBROWSKI, V.L., FIÚZA, L.M., PASQUALI, G., BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciencia Rural**, v. 34, p. 843-850, 2003.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 43, p. 288-292, 1984

BOUCIAS, D. G.; STOKES, C.; SUAZO, A.; FUNDERBUCK, J. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v. 92, p. 638–648, 2000.

CARNER, G.R. **Sampling pathogens of soybean insect pests**. New York, Springer-Verlag, 1980 p. 559-574.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006

BRAVO, A., JANSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 237-246, 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90004-N](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(92)90004-N)>.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435. 2007

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P. NÚÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n.12, p. 4965-4972, 1998.

CABI & OEPP/EPPO. Data Sheets on Quarantine Pests nº 110, *Helicoverpa armigera* Bulletin OEPP/EPPO: 159-164 (1992).

CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O.; ARANTES, O.M.N.; REGIS, L.N.; VEGA, O.F-L.; BENINTENDE, G.B.; GUIMARÃES, S.E.; ARRUDA, R.O.M.; MORAES, R.O. Produção de bactérias entomopatogênicas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.239-256.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARRUTHERS, R. I.; FENG, Z.; ROBSON, D. S.; ROBERTS, D. W., In vivo temperature-dependent development of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mycosis of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 46, p. 305-311, 1985

CHANDLER, D., DAVIDSON, G. Evaluation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against soil-dwelling stages of cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) in glasshouse and field experiments and effect of fungicides on fungal activity. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 1856-1862, 2005

CHANG, X.; WU, Q.; WANG, S.; WANG, R.; YANG, Z.; CHEN, D.; JIAO, X.; MAO Z.; ZHANG, Y. Determining the involvement of two aminopeptidase Ns in the resistance

of *Plutella xylostella* to the Bt toxin Cry1Ac: cloning and study of in vitro function. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, Hoboken, v. 26, n. 2, p. 60-70, 2012.

CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, v. 40, p. 241-321, 2003.

CHOUGULE, N. P.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p 355–367, 2005.

COATES, B. S., HELLMICH R. L., LEWIS L. C. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycotina: Hyphocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. **Genome**, v. 45, n.1, p. 125-132, 2002.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000. Disponível em: <10.1002/1526-4998(200008)56:8<651>.

CORRÊA, B. S; SMITH, J. G. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner, in Paraná. **Florida Entomologist**, v. 58, p. 280, 1975.

CPL BUSINESS CONSULTANTS. **The 2010 worldwide biopesticides market summary**. Walingford: CAB International Centre, 2010. v. 1, p. 1-39.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. 2012. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 3, p. 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, p. 143-150, 1983.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 40, p. 193-199, 2001

DONG, C.; ZHANG, J.; CHEN, W.; HUANG, H.; HU, Y. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. **Microbiological Research**, v. 162, p. 53-61, 2007

DOWD, P. F.; VEGA, F. E. Autodissemination of *Beauveria bassiana* by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to overwintering sites. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, p. 65–75, 2003.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v.104, n.2, p.134-150,2000.

DULMAGE, H. D. Insecticidal activity of HD1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, p. 232–239, 1970.

ENTWISTLE P.F., CORY J.S., BAILEY M.J., HIGGS S. ***Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice***, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1993.

ESTRUCH, J. J.; WARR EN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 93, n. 11, p. 5389–5394, 1996.

FAN, Y., KRUEER, S. N., KEYHANI, N. O. High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, p. 274-279, 2011.

FARIA, M. R.; TIGANO-MILANI, M. S; LECUONA, R. E. Incidência natural de *Nomuraea rileyi* Farlow em população de *Anticarsia gemmatalis* Hübner no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 22, p. 385-388, 1993.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLIJS, J.; SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, p. 1118–1120, 1969

FAUNA EUROPAEA.: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=449072

FERNANDES, E. K. K. FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P.. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 98, n. 4, p. 324-332, 2006.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v. 23, p. 409-442, 1978.

FIGUEIREDO, E.; AMARO, F.; GONÇALVES, C.; GODINHO, M.; SALVADO, EVA; ALBANO, S. Lagarta do tomate in AMARO, F. & MEXIA, A. **Proteção integrada em tomate de indústria**. Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, 2006.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 17-52, 1989.

GARDNER, W. A. Effect of temperature on the susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 46, p. 348-349, 1985.

GETZIN, L. W. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, na entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). ***Journal of Invertebrate Pathology***, v. 3, p. 2-10, 1961.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 350.

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; HERRERO, S.; SAYYED, A. H.; ESCRICHE, B.; LIU, Y.B.; MEYER, S. K.; WRIGHT, D.J.; TABASHNIK, B.E.; FERRE J. Variation in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. ***Applied and Environmental Microbiology***, v.67, p.4610-4613, 2001

GUO, Y. Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. ***Acta Entomologica Sinica***, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1997.

GUOQING, L.; ZHAOJUN, H.; LILI, M.; XIAORAN, Q.; CHANGKUN, C.; YINCHANG, W. Natural oviposition-deterrent chemicals in female cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). ***Journal of Insect Pathology***, v. 47, n. 9, p. 951-956, 2001.

GUPTA, B. L.; DOW, J. A. T.; HALL, T. A.; HARVEY, W. R. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v. 74, p. 137-152, 1985.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. E. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446

HABIB, M.E.; ANDRADE, C.F.S. Controle microbiano de insetos com o uso de bactérias. **Informe Agropecuário**, v.15, n.167, p.21-26, 1991.

HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. **Nature**, v. 172, p. 1004, 1953. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/1721004a0>>.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-44.

HARDWICK, D. The corn earworm complex. **Memories Entomology Society**, v. 40, p. 246, 1965

HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. A. Diseases caused by certain spore-forming bacteria. In: STEINHAUS, E. A. **Insect pathology: an advanced treatise**. New York: Academic Press, p . 21–73, 1963.

HAJEK, A. E.; CARRUTHERS, R. I.; SOPER, R. S. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga mainaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environmental Entomology**, v. 19, p 85-90, 1990.

HEGDE, R.; LINGAPPA, S.; PATIL R. K.; RACHAPPA V.; RAMEGOWDA G. K. Ecological manipulation in rainfed cotton ecosystem to enhance the efficacy of *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson. **Proc. Int. Symp. Strategies Sustain Cotton Prod. Global Vision**, v. 3, p. 230-232, 2004.

HERNÁNDEZ, C. S.; ANDREW, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n. 1, p. 8-16, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2004.10.006>>.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; KRISHNAN, V.; CRICKMORE, N.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Lack of Cry1Fa binding to the midgut brush border membrane in a resistant colony of *Plutella xylostella* moths with a mutation in the ABCC2 locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6759-6761, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01689-12>>.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989

HUSZ B. Field experiments on the application of *Bacillus thuringiensis* against the corn borer, **Int. Corn Borer Invest. Sci. Repts**, v. 3, p. 91–98, 1930.

IGNACIMUTHU, S.; JAYARAJ, S. Ecofriendly approaches for sustainable pest management. **Current Science**, v. 84, p. 10–25, 2003.

IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; GARDNER, W. A. Temperature stability of wet and dry conidia of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Environmental Entomology**, v. 14, p. 87-91, 1985.

IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D. L.; PINNELL, R. E. Laboratory studies on the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*: soil-borne contamination of soybean seedlings and dispersal of diseased larvae of *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, p. 147-152, 1977.

IGNOFFO, C. M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, p. 513-538. In H.D. Burgers (ed.), **Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980**. London, Academic Press, 949, 1981.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), . **Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential**. CABI Publishing, pp. 23–69, 2001

ISHIWATA S. On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1), **Dainihon Sanshi Kaiho**, v.114, p. 1–5, 1901 (original em japones).

JAYARAJ, S., REED, W., & KUMBLE, V. Biological and ecological studies of Heliothis. In **Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management**. ICRISAT Center, Patancheru, India, 15-20 November 1981 p. 17-28. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.

JOHNSON, D. E.; MCGAUGHEY W. H. Natural mortality among Indianmeal moth larvae with resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 68, p. 170–172, 1996

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, Washington, v. 42, n. 2, p. 112-122, 1992.

JUNG, H. S.; LEE, H. B.; KIM, K.; LEE, E. Y. Selection of Lecanillium strains for aphid (*Myzus persicae*) control. **The Korean Journal of Mycology**, v. 34, p. 112-118, 2006.

KARIM, S., RIAZUDDIN, S., F. GOULD & D. H. DEAN. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 67, p. 198–216, 2000

KAUR, G.; PADMAJA, V. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera; Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR, **African journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 299-307, 2008.

KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, p. 464-480, 2014. Disponível em <<http://doi:10.3852/13-052>>

KISH, L. P.; SAMSON, R. A.; ALLEN, G. E. The genus *Nomuraea* Maublanc. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 24, p.154–158, 1974

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 24, p. 275–308, 1994

LAMMERS, J. & MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hbn). **Plant Protection Service (NL) and Central Science laboratory (UK)**, v. 18, 2007.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). 2007. Disponível em : <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, S.; GONZÁLEZ, J. M. Jr. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin and a new

exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 6, p. 3172–3179, 1990.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 815–821, 1991

LIAO, C.Y., HECKEL, D.G., AKHURST, R., 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 55–63.

LOMER, C. J.; BATEMAN, R. P.; JOHNSON, D. L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 667–702, 2001.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SILVA-WERNECK, J. O.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 65-6, 2007.

MARTINS, F. Grau de ataque de *Heliothis armigera* em tomate de indústria. I **Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas**, v.1, p. 154-159, 1990.

MATTHEWS, M. **Heliothinae moths of Australia: a guide to pest bollworms and related noctuid groups**. Melbourne: CSIRO, 1999. p. 320.

MCDONALD, D. M.; RICHARD, A. N. Effects of relative humidity and temperature on *Entomophaga anlicae* conidium discharge from infected eastern hemlock looper larvae and subsequent conidium development. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 84-90, 1995.

McCLINTOCK, J. T.; SCHAFFER, C. R.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 45, n. 2, p. 95-105, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.2780450202>>.

MEADOW, R.; VANDENBERG, J. D.; SHELTON, A. M. Exchange of inoculum of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) between adult Xies of the cabbage maggot *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 479-485, 2000.

MENSAH, R. K. Supresssion of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, v. 35, n. 4, p. 323-329, 1996.

METALNIKOV S., CHORINE V. On the Infection of the Gypsy Moth and certain other Insects with *Bacterium thuringiensis*, **Int. Corn. Borer Invest. Sci. Repts**, v. 2, p. 60-61, 1929.

METALNIKOV S., HERGULA B., STRAIL D.M. Experiments on the Application of Bacteria against the Corn Borer, **Int. Corn. Borer Invest. Sci. Repts**, v. 3, p. 148–151, 1930.

MEYLING, N.V., EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 113, p. 336–341, 2006.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 163-200.

MONNERAT, R. G.; PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Ed.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2006. p. 121-155.

MONNERAT, R.G.; POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, v. 1, n. 1/2, p. 114-124, 2005.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1986. p. 127-170.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, p. 17-26, 2011.

NASREEN, A. & MUSTAFA, G. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hbn) reared in laboratory on natural diet. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 3, n. 10, p. 1668-1669, 2000.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**, v. 19, p. 669–676, 2000

NAZRUSSALAM, A. A.; AHMAD, T.; ALI, H. Relative performance of insecticides and multineem schedules for management of pod borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner) in pigeonpea. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 1545-1547, 2007.

NIBOUCHE, S.; BUES, R.; TOUBON, J. F.; POITOUT, S. Allozyme polymorphisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. **Heredity**, v. 80, p. 438–445, 1998.

OEPP – European and Mediterranean Plant Protection Organization. PQR 5, Standart Program Database of quarantine pests. Disponivel em <<http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>>

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, v. 23, p. 275-285, 2004.

OWNLEY, B. H.; GWINN K. D.; VEGA F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, p. 113-128, 2010.

PASHLEY, D. P. Current status of fall armyworm host strains. **Florida Entomologist**, v. 71, n. 2, p. 227-234, 1988.

PATIL, S.; BASHASAB, F.; VIJAYKUMAR; BASAVANAGOUD; KURUVINASHETTI, M. S.; PATIL, B. V. Genetic relatedness among *Helicoverpa armigera* (Hübner) occurring on different host plants as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.9, p.227-233, 2006

PAWAR, C. S.; BHATNAGAR, V. S.; JADHAV, D. R. Heliothis species and their natural enemies, with their potential for biological control. **Proceedings Indian Academy of Sciences**, v. 95, p. 695-703, 1986.

PENG, G.; WANG, Z.; YIN, Y.; ZENG, D.; XIA, Y. X. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. **Crop Protection**, v. 27, p. 1244–1250, 2008

POGUE, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, v. 1, n. 1/2, p. 114-124, 2005.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v .7, n. 2, p. 1-10, 2003.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100204X2004000100002>>.

QUESADA-MORAGA, E.; MARANHÃO, E. A. A.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. 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. 247-287, 2006.

RAMOS, F. R. **Avaliação a campo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica à lepidoptera e seu possível efeito adverso sobre espécies não-alvo.** 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

REDDY, S. T.; KUMAR, N. S.; ESWERLU, G. V. Comparative analysis of intracellular proteases in sporulates *Bacillus thuringiensis* strains. **Biotechnology Letter**, v. 20, n. 3, p. 279–281, 1998

REED, W. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in western Tanganyika: II. Ecology and natural and chemical control. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 1, p. 127-140, 1965.

ROBERTS, D. W; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1–70, 2004.

SAHAYARAJ, K., FRANCIS, BORGIO, J. Virulence of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Metsch.) Sorokin on seven insect pests. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 44, p. 195-200, 2010

SAMPSON, M. N.; GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**, v. 144, part 8, p. 2189–2194, 1998.

SANCHIS V., BOURGUET D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 28, p. 11–20, 2008.

SANCHIS, Vincent. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for sustainable development**, v.31, p. 217-231, 2010.

SCHNEPF, H. E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

SEKULIC, R.; TATJANA, K.; MASIREVIC, S.; VAJGAND, D.; GORDANA, F.; RADOJCIC, S. **Incidence and damage of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hbn.) in Vojvodina Province in 2003** Biljni Lekar Plant Doctor, 32 (2004), pp. 113–124

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. A. **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413–423. 2003

SHARMA, H. C.; DHILLON, M. K.; ARORA, R. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ - endotoxin-fed *Helicoverpa armigera* on the survival and development of the

parasitoid *Campoletis chloridae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 126, n. 1, p. 1-8, 2008.

SHARMA, P. K.; KUMAR, U.; VYAS, S.; SHARMA, S.; SHRIVASTAVA, S. Monitoring of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) through pheromone traps in chickpea (*Cicer arietinum*) crop and influence of some abiotic factors on insect population. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 5, n. 5, p. 44-46, 2012.

SRISUKCHAYAKUL, P.; WIWAT, C.; Pantuwatana, S. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. **Science Asia**, v. 31, p. 273-276, 2005

SRIVASTAVA, C. P.; AHMAD, R.; UJAGIR, R.; DAS, S. B. *Helicoverpa armigera* management in pulses-present scenario and future strategies. In: **Recent Advances in Helicoverpa armigera Management**, p. 265-286, 2005

ST. LEGER R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 271–276, 2008.

STEINHAUS E. A. Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. **Hilgardia**, v. 20, p. 359–381, 1951

STEINHAUS, E. A. On the correct author of *Bacillus sotto*. **Journal of Insect Pathology**, v. 3, p. 97-100, 1961.

SUJII, E.; CARVALHO, V.; Tigano, E. Cinética da Esporulação e Viabilidade de Conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre Cadáveres da Lagarta-da-Soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae), em Condições de Campo. **Neotropical Entomology**, v.31 , p. 85-90, 2002

SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; DE LOBO SOUZA, M. Baculoviruses– re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, v. 24, p.143–160, 2006.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. Associations between insects and nonpathogenic microorganisms. **Insect Pathology**, pp. 12–51. New York: Academic, 1993.

TANG, L. C.; HOU, R. F. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 125, p. 243-248, 2001.

THIERY, I.; DELECLUSE, A.; TA MAYO, M. C.; ORDUZ, S. Identification of a gene for Cyt1A–like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal–negative *B. thuringiensis* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n. 2, p. 468–472, 1997

THOMAS, M. B.; READ, A. F. Fungal bioinsecticide with a sting. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1367-1368, 2007.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, v. 60, p. 181–197, 1983.

THUNGRABEAB, M., TONGMA, S. Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) KMITL. **Science technology**, v.7, n.1, p. 8-12, 2007.

TOJO, A.; AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 576–580, 1983

VALICENTE, F. H., BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 639-644, 2003

VAN FRANKENHUYZEN K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 1-16, 2009.

VICKERS, R. A.; FURLONG, M. J.; WHITE, A.; PELL, J. K. Initiation of fungal epizootics in diamondback moth populations within a large Weld cage: proof of concept for auto-dissemination. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 111, p. 7–17, 2004.

VIMALA DEVI, P. S; PRASAD, Y. G. *Nomuraea rileyi* – a potential mycoinsecticide. In: Upadhyay RK, Mukherji KG, Chamola BP, eds. **Biocontrol Potential and its**

Exploitation in Sustainable Agriculture, Vol. 2, Insect Pests. New York, p. 23–38, 2000.

VIMALA DEVI, P. S.; PRASAD, Y. G.; ANITHA CHOWDARY, D.; MALLIKARJUNA RAO, L.; BALAKRISHNAN, K. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Mycopathologia**, v. 156, p. 365–373, 2003.

WANG, C.; ST LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 6647–6652, 2006.

WIDMER, M. W.; SCHOFIELD, P. Heliothis Dispersal and Migration. **Tropical Development and Research Institute**, London. 1983

WU, K. M. Regional management strategy for cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in China. **Control of Insect Pests**, v.7, p.559-565, 2007

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-Le ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 81-100, 2000.

YU, G. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium

cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 532–536, 1997

ZALUCKI, M. P.; DAGLISH, G.; FIREMPONG, S.; TWINE, P. The biology and ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? **Australian Journal of Zoology**, v. 34, n. 6, p. 779-814, 1986

ZIMMERMAN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potencial as a biocontrol agente. **Pesticide Science**, v. 37, p.375-379, 1993

Capítulo 2 - Suscetibilidade de diferentes ínstares de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) à bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner

Resumo: A suscetibilidade de diferentes ínstares de duas populações de *Helicoverpa armigera* a bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*, encontradas nos produtos comerciais Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] foi estudada utilizando contaminação da superfície da dieta para lagartas de primeiro ínstar e incorporação das toxinas na dieta para os demais ínstares. Lagartas de *H. armigera* expostas aos produtos biológicos entre o 2º e 5º ínstares foram menos suscetíveis que lagartas de 1º ínstar com a mortalidade variando entre 31 a 88%, respectivamente. Na maioria dos tratamentos não houve diferenças significativas na suscetibilidade encontrada entre 2º, 3º, 4º ínstares. As lagartas de 5º ínstar apresentaram menor mortalidade em todos os tratamentos. A presença de várias toxinas Cry nestes bioinseticidas pode ser fator determinante do efeito sobre o inseto. As diferenças na suscetibilidade entre os estádios demonstram a necessidade de conhecer a composição etária da praga em condições de campo a fim de determinar qual o melhor período de aplicação.

Palavras chave: Controle biológico; Bactéria entomopatogênica; Toxinas Cry.

1. Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie-praga responsável por grandes prejuízos econômicas em todo o mundo [1-3], devido ao seu hábito polífago e ampla distribuição geográfica [4-6]. Recentemente, o primeiro relato de ocorrência desta espécie no continente Americano foi feito no Brasil [7]. As lagartas de *H. armigera* alimentam-se de folhas e caules, causando danos diretos e indiretos em mais de 100 espécies de plantas cultivadas e silvestres, compreendendo 45 famílias hospedeiras, incluindo Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae [8-10]. No Brasil, foi constatada a presença de *H. armigera* se alimentando de algodão, soja, milho, tomate, feijão, sorgo, milheto, guandu, trigo, crotalária e plantas daninhas [11].

Devido a sua alta capacidade de migração, é possível a formação de diferentes populações de *H. armigera*, com conseqüente isolamento reprodutivo, de forma a originar populações fisiologicamente diferentes, o que pode influenciar na suscetibilidade às táticas de controle e implicar na necessidade de elaboração de sistemas de manejo de acordo com a variabilidade populacional. A variação na resposta frente à redução populacional da praga pode ocorrer também com a utilização do controle microbiano, conforme observado para populações de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), oriundas de países da América Latina, Europa e de diferentes estados brasileiros [12-14]. Este fato reforça a necessidade de se utilizar todas as ferramentas do manejo, de maneira específica para a população de cada região.

A ausência de plantas resistentes e a falta de medidas de controle adequadas ao controle de *H. armigera* dificultam a redução populacional deste inseto no campo [1]. Devido ao uso intensivo de inseticidas em países onde essa praga causa elevados danos econômicos, estas populações têm desenvolvido resistência a vários grupos de inseticidas, como os piretróides, além de alguns ingredientes ativos considerados recentes, como fipronil, clorfenapir, indoxacarbe e spinosad [15-17].

Os relatos da rápida evolução da resistência em populações desta espécie e o aumento da cobrança por parte do público consumidor por uma produção de alimentos mais saudável e sustentável têm levado os agricultores a buscar medidas alternativas aos agrotóxicos. Entre estas, a utilização de agentes de controle microbiano de pragas, com destaque a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) [18-23]. A suscetibilidade de *H. armigera* a proteínas Cry é relatada na literatura [24]. Na Austrália, China e Índia as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry2Ab controlaram de maneira satisfatória *H. armigera* [25-26]. Porém, o manejo de *H. armigera* no Brasil ainda se encontra em fase inicial, portanto são imprescindíveis estudos que avaliem a suscetibilidade de *H. armigera* aos agentes de controle microbiano, considerando a possível variabilidade populacional. O objetivo da pesquisa foi verificar a suscetibilidade dos ínstares larvais de duas populações distintas de *H. armigera* a diferentes toxinas encontradas em produtos comerciais biológicos à base de *B. thuringiensis*.

2. Resultados e Discussão

2.1 Mortalidade de diferentes ínstares de *H. armigera* a bioinseticidas à base de *Bt*.

As lagartas de primeiro ínstar de ambas as populações de *H. armigera* não apresentaram diferenças significativas quanto a mortalidade, sendo portanto suscetíveis as toxinas Cry presentes nos produtos biológicos Dipel[®] (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2), Xentari[®] (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C e Cry1D) e Agree[®] (Cry1Ac, Cry1C, Cry1D e Cry2), com mortalidade variando entre 80 e 88% . Entretanto, a suscetibilidade em larvas neonatas de *H. armigera* foi significativamente maior quando comparada aos demais ínstares das duas populações (Figura 1).

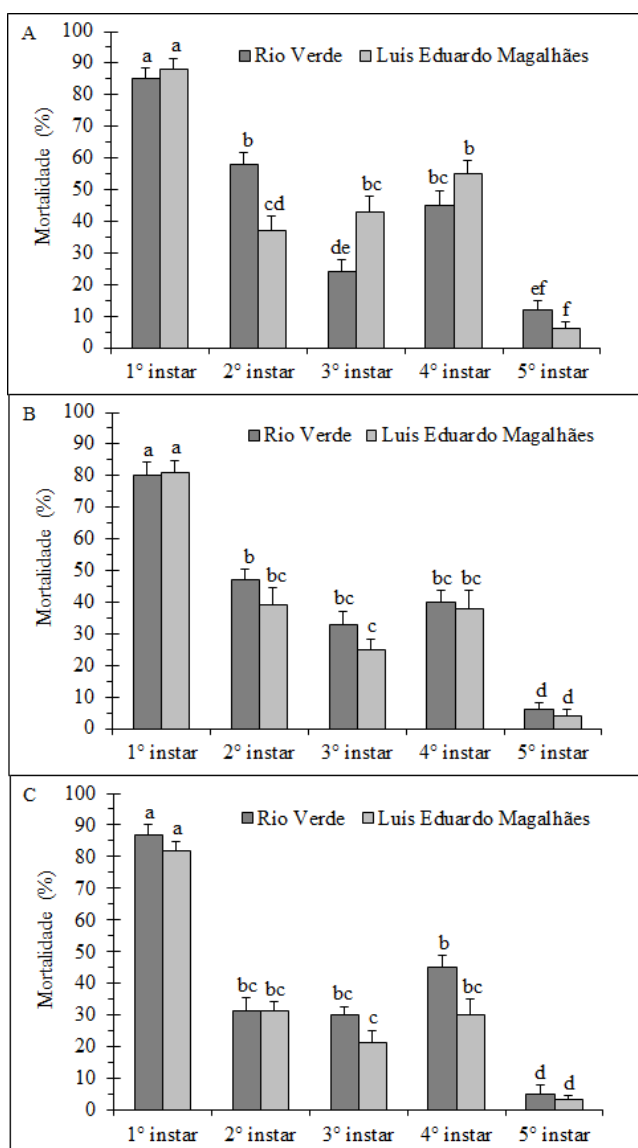
As proteínas Cry são normalmente formadas em combinações de estirpes naturais de *B. thuringiensis* [27], muitas vezes com mais de uma toxina. Esta característica torna difícil identificar o potencial individual de determinada toxina Cry. A associação de toxinas pode ser essencial para o sucesso comercial de um bioinseticida. As toxinas Cry presentes nos produtos biológicos testados mostraram-se eficientes ao controle de *H. armigera*, especialmente para o primeiro ínstar, relatado como o mais suscetível em outros trabalhos [28-29]. As proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, Cry1D e Cry1F encontradas nos produtos comerciais também foram relatados como tóxicas à *H. armigera* [24,25,26,30].

Para a associação das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2 encontradas no Dipel[®], a mortalidade de lagartas de 2º ínstar foi de 58 para a população RV, que diferiu significativamente da população LEM, com mortalidade de 37 (Figura 1A). Lagartas de terceiro ínstar, quando expostas a associação destas toxinas, apresentaram mortalidade de 24 para a população de RV e de 43 para a população LEM ($F = 52,06$; $gl = 9, 90$; $P < 0,001$). Porém, lagartas de quarto e quinto ínstar não apresentaram diferença significativa quanto à mortalidade entre as duas populações (Figura 1A). A menor suscetibilidade foi observada em lagartas de quinto ínstar, com mortalidade de 12% para a população RV, e de 6% para a população LEM (Figura 1A).

As toxinas Cry presentes no produto comercial Xentari[®] não ocasionaram mortalidade significativa para as populações RV e LEM quando comparadas para cada ínstar larval (Figura 1B). O quinto ínstar foi menos suscetível às toxinas presentes no referido produto biológico, diferindo significativamente dos demais ínstares, com mortalidade de 6 % para a população RV, e de 4 % para a população LEM ($F = 42,98$; $gl = 9, 90$; $P < 0,001$) (Figura 1B). Em relação às toxinas Cry, presentes no a do produto biológico Agree[®], observou-se que lagartas de quinto ínstar foram menos suscetíveis em relação aos demais ínstares, com

mortalidade de 5,00 % para a população RV, e de 3,00 % para a população LEM (F = 68,18; gl = 9, 90; P < 0,001) (Figura 1C).

Figura 1. Mortalidade média (%) dos diferentes ínstars larvais de duas populações de *Helicoverpa armigera* submetidas às toxinas presentes no produto biológico Dipel® (A), Xentari® (B) e Agree® (C). Colunas representadas por cada tratamento, seguida de mesma não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). A barra de erro representa o erro padrão (\pm EP).



Os estudos realizados com toxinas Cry individualizadas, visando o controle de *H. armigera*, ressaltam a grande importância da interação Cry1Ab e Cry1Ac, com Cry2Aa e Cry2Ab [24, 26, 31]. Bird et al. [32] também constataram maior mortalidade em lagartas de primeiro ínstar de *H. armigera* e *H. punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae), quando comparada aos demais ínstars, utilizando isoladamente as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab, presentes os produtos biológicos Dipel[®] e Agree[®] Isolados contendo as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C e Cry1D apresentaram mortalidade acima de 90% em lagartas de *H. armigera* [33], sendo as mesmas encontradas no produto biológico Xentari[®].

A elevada mortalidade causada pela associação de toxinas contidas nos produtos comerciais pode ser justificada pelo sinergismo entre estas, pois, toxinas como Cry1Ac e Cry2Aa podem agir conjuntamente e ocasionar maior mortalidade, pois possuem sítios de receptores diferentes, não competindo entre si pelos mesmos receptores [34], o que potencializa a eficácia dos produtos que possuem diferentes toxinas em sua composição. Além da associação de toxinas, os produtos biológicos Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] são compostos por cristais e esporos de *B. thuringiensis*, cuja interação também pode promover maior toxicidade ao produto biológico em relação à determinada praga. A toxicidade da mistura entre esporos e cristais é maior quando comparado à toxicidade independente dos seus componentes, no entanto, o sinergismo entre esporos e toxinas depende das concentrações desses dois componentes na solução utilizada [35].

A comparação da mortalidade de lagartas de 1º ínstar dentro da população RV não mostrou resultados significativos entre as toxinas presentes nos produtos biológicos, sendo 85 % para Dipel[®], 80 para Xentari[®] e 87 ± 3 % para Agree[®], porém todos os formulados apresentaram diferença significativa quando comparados com o tratamento controle, com mortalidade de 9 % ($F = 111,95$; $gl = 3, 36$; $P < 0,001$) (Figura 2A). O mesmo ocorreu com os resultados obtidos em lagartas de 1º ínstar da população LEM, em que a mortalidade foi de 88,00 % quando se utilizou Dipel[®], 81 % para Xentari[®] e 82 % para Agree[®], diferindo da testemunha, que apresentou mortalidade de 10,00 % ($F = 129,09$; $gl = 3, 36$; $P < 0,001$) (Figura 2B).

O produto biológico Dipel[®] causou maior mortalidade em lagartas de 2º ínstar da população RV quando comparada aos demais produtos, com mortalidade de 58,00 %, enquanto que Xentari[®] e Agree[®] causaram mortalidade de 47,00 % e 31,00 %, respectivamente ($F = 59,38$; $gl = 3, 36$; $P < 0,001$) (Figura 2C). Entretanto, para a população

LEM não foi observada diferença significativa em relação à mortalidade de lagartas de segundo ínstar (Figura 2D). Para lagartas de 3º ínstar não houve diferença quanto à mortalidade relacionada entre o uso dos produtos biológicos para com a população RV, enquanto que para a população LEM, a maior mortalidade foi observada para o tratamento com Dipel® (Figura 2E,F). Em relação ao quarto ínstar, as toxinas presentes no formulado biológico Dipel® também ocasionaram maior mortalidade em relação aos demais tratamentos, com $45,00 \pm 4,77\%$ ($F = 30,23$, $gl = 3, 36$; $P < 0,001$) (Figura 2H). Em lagartas de quinto ínstar não houve diferença significativa entre os produtos biológicos testados, para ambas as populações (Figura 2I,J).

A redução na mortalidade de lagartas à medida que estas se desenvolvem também foi observado em estudos com *H. zea* [36-37]. A diminuição na suscetibilidade de diferentes ínstars aos formulados à base de *B. thuringiensis* também foi observada para *H. armigera* e *H. punctigera*, quando expostas ao Cry2Ab. No entanto, Cry1Ac foi igualmente tóxica para neonatas e lagartas de 3º ínstar de *H. punctigera* [32]. Liao et al. [26] relataram que a mortalidade de *H. armigera* diminuiu significativamente no quinto ínstar em comparação com o segundo ínstar, sem diferença na mortalidade entre o terceiro ínstar e neonatas, com dieta incorporada por solução de Dipel®.

Os resultados encontrados mostram que lagartas de ínstars mais adiantados são menos suscetíveis às toxinas presentes nos formulados comerciais, em que, a toxicidade dos produtos utilizados diminui com o aumento da idade larval. A redução de toxicidade para estádios mais adiantados tem sido observada em várias espécies de insetos em relação a *B. thuringiensis* [29,37,39]. Em contrapartida, há relatos conflitantes na literatura sobre a suscetibilidade de diversos ínstars para *B. thuringiensis*. Alguns dos ínstars posteriores de *Cadra cautela* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) e *H. zea* foram relatados como mais suscetíveis a *B. thuringiensis* em relação aos primeiros ínstars [37,40-41]. No entanto, Cooper [43] relatou que o quinto e sexto ínstars de *H. punctigera* foram suprimidos por *B. thuringiensis* da mesma forma que os estádios anteriores.

As diferenças encontradas em testes de mortalidade com as mesmas proteínas Cry [26, 30, 32, 33, 43] podem estar relacionadas a metodologia empregada, como a incorporação da solução inseticida em dieta ou tratamento de superfície, os componentes da dieta utilizada, o nível de transformação das toxinas Cry utilizadas nos bioensaios, como as protoxinas ou

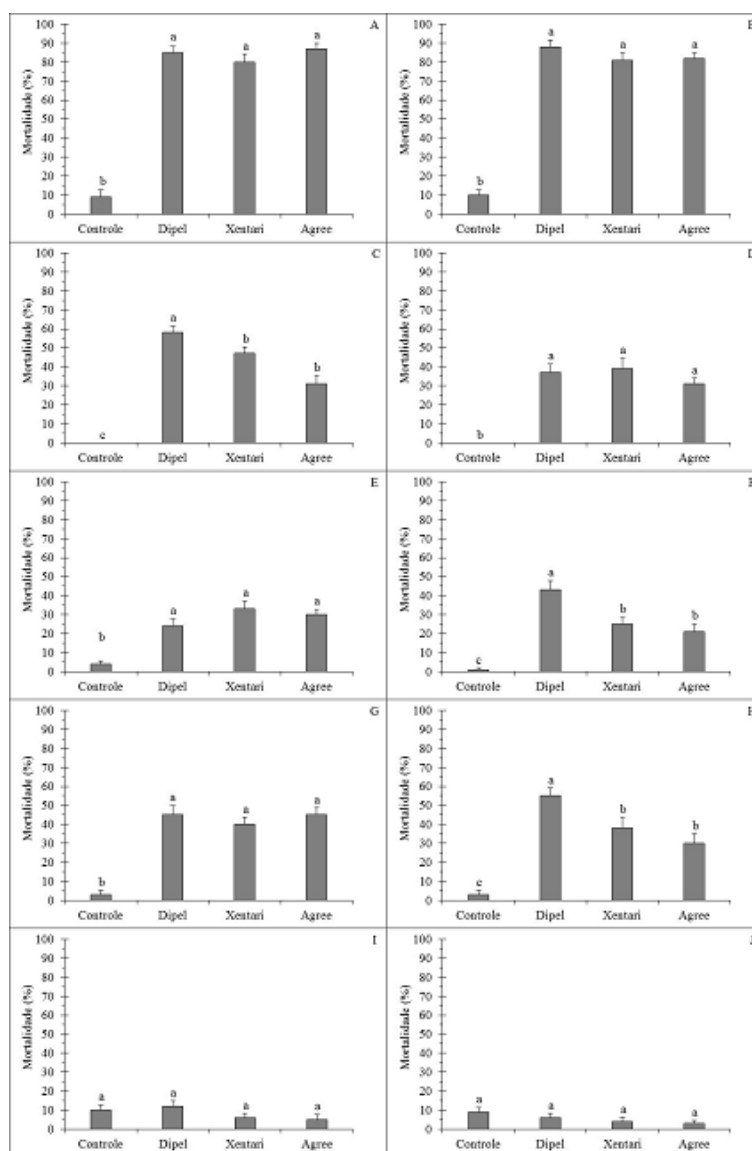
toxina ativada, o método de quantificação dos cristais proteicos, e a temperatura em que foram realizados os bioensaios [32, 43]. Portanto, os resultados obtidos em bioensaios devem ser analisados cuidadosamente [26, 30, 31, 32, 43]. Além disso, vários fatores podem causar diferenças na toxicidade relativa das proteínas Cry às mesmas espécies de insetos, como diferentes níveis de precisão obtidos por métodos de bioensaios, o uso de populações geograficamente distintas, e avaliação dos estágios de desenvolvimento de determinada espécie [24,43].

Os resultados obtidos na referida pesquisa e em outros trabalhos já citados mostram que um dos principais fatores que determinam a mortalidade é o estágio de desenvolvimento das lagartas, que foi significativamente maior para as neonatas quando comparados com os demais ínstaes. A base bioquímica da suscetibilidade reduzida entre os estádios já foi investigada em lagartas do gênero *Spodoptera* [44-45], sendo proposta uma variação na densidade de receptores de toxina durante o desenvolvimento das lagartas, o que explica a diminuição da capacidade das toxinas Cry em induzir alterações na permeabilidade das microvilosidades das células estriadas epiteliais do intestino médio em lagartas de estádios tardios. Para *H. armigera*, os alvos das proteínas Cry de *B. thuringiensis* são as microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio. Uma vez que a toxina se liga aos receptores das células epiteliais, estas proporcionam a lise celular [46].

Raussell et al. [29] demonstraram em seu trabalho com *Thaumetopoea pityocampa* (Schiff) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) diminuição da afinidade entre um dos dois receptores de Cry1Ab durante o desenvolvimento das lagartas, o que contribuiu com a redução na suscetibilidade desta toxina com o aumento da idade das lagartas. A diferença na suscetibilidade entre os estádios mostraram que os danos para as culturas tendem a aumentar com os estádios posteriores, o que resulta em um controle eficiente no início do aparecimento do inseto na área. Portanto, é necessário determinar um sistema de amostragem em campo para detectar a presença e analisar a idade da praga, com o intuito de efetuar o controle nos primeiros ínstaes. Em países onde *H. armigera* esta amplamente disseminada existe um sistema de manejo que envolve feromônio sexual, monitoramento, plantas expressando toxinas de *B. thuringiensis*, vírus da poliedrose nuclear, *Trichogramma* spp. e inseticidas [47]. A falta de uma estratégia de MIP para esta praga tem incrementado o mercado de agentes de controle muitas vezes não apropriados para o controle de *H. armigera* no Brasil. Estes

resultados devem ser contabilizados durante o desenvolvimento de uma estratégia de manejo desse inseto praga para o uso da toxina *B. thuringiensis* como agente de controle.

Figura 2. Mortalidade média (%) de *H. armigera* relacionada às toxinas presentes nos produtos biológicos a base de *B. thuringiensis*. (A) 1º ínstar população RV; (B) 1º ínstar população LEM; (C) 2º ínstar população RV; (D) 2º ínstar população LEM; (E) 3º ínstar população RV; (F) 3º ínstar população LEM; (G) 4º ínstar população RV; (H) 4º ínstar população LEM; (I) 5º ínstar população RV; (J) 5º ínstar população LEM. Colunas representadas por cada tratamento, seguida de mesma não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A barra de erro representa o erro padrão (\pm EP).

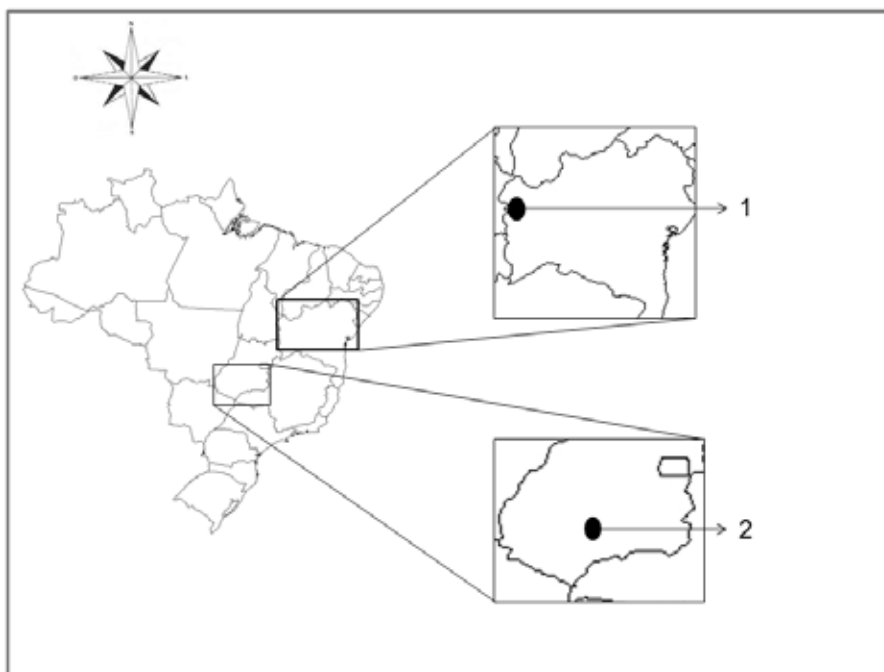


3. Seção Experimental

3.1 *H. armigera*

Duas populações distintas de *H. armigera*, provenientes dos municípios de Rio Verde (GO) e Luís Eduardo Magalhães (BA) (Figura 3), presentes na cultura da soja (*Glycine max* L.), foram utilizadas nos bioensaios. As duas populações foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas (MG), Núcleo de Biologia Aplicada, Área de Pesquisa em Controle Biológico, sob coordenação do Dr. Fernando Hercos Valicente, em um total de 100 lagartas de cada população.

Figura 3. Localização das coletas das duas populações de *Helicoverpa armigera* utilizadas na referida pesquisa. (1) município de Luis Eduardo Magalhães (BA); (2) município de Rio Verde (GO).



Os insetos foram conduzidos ao laboratório e identificados, sendo realizada a criação massal por 10 gerações, para posterior confecção dos bioensaios. Para a criação foi utilizada uma dieta artificial proposta por GREENE et al. [48] com a adição de uma solução vitamínica (ácido fólico: 0,125 g; biotina: 0,01 mg; vitamina B12: 0,001 g; vitamina B6: 0,125 g; vitamina B2: 0,25 g; vitamina B1: 0,125 g; vitamina B5: 0,5 g; e vitamina B3: 0,5 g) diluída em 100 mL de água estéril.

3.2 Patogenicidade de *B. thuringiensis* à *H. armigera*

Para realização dos bioensaios foram selecionados três formulados comerciais à base de *B. thuringiensis*, Dipel[®] PM (Sumitomo Chemical do Brasil repres. Ltda), com as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2 presentes em sua formulação, Xentari[®] WG (Sumitomo Chemical do Brasil repres. Ltda.), que contém em sua composição as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C e Cry1D, e Agree[®] WG (Bio Controle Métodos de Controle de Pragas Ltda), composto pelas toxinas Cry1Ac, Cry1C, Cry1D e Cry2. Foram realizados pré-testes para determinar a concentração dos produtos biológicos responsáveis por ocasionar mortalidade entre 80 a 95% de lagartas de 1º ínstar de *H. armigera*, sendo então determinada a concentração de 1×10^7 esporos/mL. Foram realizados também dois pré-testes para avaliar o melhor método de bioensaio para os diferentes ínstars do inseto, relacionados com a aplicação superficial de uma pequena alíquota da solução de *B. thuringiensis* na dieta e também pela incorporação da solução na dieta, conduzidos de acordo com Beegle [49] e Ferré et al. [50].

Os ensaios para lagartas de primeiro ínstar foram realizados em recipientes plásticos esféricos de 2 cm de diâmetro e 3 cm de altura. Em cada recipiente plástico foi vertido dieta de criação até completar 1 cm de altura. Após a secagem da dieta foi aplicado superficialmente 50µL da solução de cada produto comercial biológico, em que, após a evaporação do excesso de umidade, foi inserida uma lagarta de primeiro ínstar com menos de 24 h de vida, em um total de 100 lagartas por tratamento, em que, cada conjunto de 10 lagartas representou uma repetição. Para as lagartas de 2º, 3º, 4º e 5º ínstars, a dieta foi preparada com um teor de água reduzido em 10%, em que, a dieta foi mantida líquida em banho-maria entre 55-60 °C, ao atingir esta temperatura era acrescentado à dieta a solução de cada produto a base de *B. thuringiensis*, a dieta então foi vertida nos recipientes plásticos e, após a secagem da mesma, foi inserida uma lagarta para cada recipiente. A idade das lagartas utilizadas foi entre 12 a 24 h após a muda.

O mesmo procedimento foi realizado para o controle, porém, utilizando-se somente água destilada estéril sobre ou incorporada à dieta. Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada (26 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 h). A patogenicidade dos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* foi avaliada diariamente até o sétimo dia, para a determinação da mortalidade.

3.3 Análise dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 10 repetições. Os dados de mortalidade foram corrigidos de acordo com metodologia proposta por Abbott [51]. Quando a mortalidade no tratamento controle foi superior a 10%, o referido bioensaio foi descartado e novamente conduzido. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico SAS Institute [52].

4. Conclusão

As toxinas contidas nos produtos comerciais Dipel[®], Xentari[®] e Agree[®] foram eficientes no controle das duas populações estudadas, principalmente sobre lagartas de primeiro ínstar.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente por coletar e gentilmente ceder as primeiras lagartas de *Helicoverpa armigera*, e ao Dr. Steven C. Passoa (USDA) pela identificação e confirmação da espécie das lagartas utilizadas nesse trabalho.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências e notas

1. Chougule, N. P.; Giri, A. P.; Sainani, M. N.; Gupta, V. S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *35*, 355–67.
2. Sekulic, R.; Tatjana, K.; Masirevic, S.; Vajgand, D.; Gordana, F.; Radojicic, S. Incidence and damage of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hbn.) in Vojvodina Province in 2003. *Biljni. Lekar. Plan.t Doctor.* **2004**, *32*, 113–124
3. Ignacimuthu, S.; Jayaraj, S. Ecofriendly approaches for sustainable pest management. *Curr. Sci.* **2003**, *84*, 10–25
4. Guoqing, L.; Zhaojun, H.; Lili, M.; Xiaoran, Q.; Changkun, C.; Yinchang, W. Natural oviposition-deterrent chemicals in female cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *J. Insect. Pathol.* **2001**, *47*, 951-956.
5. Guo, Y. Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. *Acta. Entomol. Sin.* **1997**, *40*, 1-6.
6. Zalucki, M. P.; Dargatzis, G.; Firempong, S.; Twine, P. The biology and ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? *Aust. J. Zool.* **1986**, *34*, 779-814.
7. Czapak, C.; Albernaz, K. C.; Vivian, L. M.; Guimarães, H. O.; Carvalhais, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesq. Agropec. Trop.* **2013**, *43*, 110-113.
8. Ali, A.; Choudhury, R. A.; Protection, P. Some Biological Characteristics of *Helicoverpa armigera* on Chickpea. *J. Plant. Prot.* **2009**, *4*, 99–106.
9. Pogue, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2004**, *97*, 1222-1226.
10. Fitt, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* **1989**, *34*, 17-52.
11. Ávila, J. C.; Vivian, L. M.; Tomquelski, G. V.; Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. *Emprapa Agropecuária Oeste Circular Técnica.* **2013**, *23*, 1-12
12. Monnerat, R.G.; Queiroz, P.; Orduz, S.; Benitende, G.; Cozzi, J.; Real, M. D.; Ibarra, J.; Bravo, A. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7029-7035.

13. Polanczyk, R. A.; Alves, S. B.; Padulla, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biopesticides International*. **2005**, 1, 114-124.
14. González-Cabrera, J.; Herrero, S.; Sayyed, A. H.; Escriche, B.; Liu, Y.B.; Meyer, S. K.; Wright, D. J.; Tabashnik, B. E.; Ferre J. Variation in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**,67, 4610-4613.
15. Wu, K. M. Regional management strategy for cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in China. *Control. Insect. Pests*. **2007**, 7, 559-565.
16. Patil, S.; Bashasab, F.; Vijaykumar; Basavanagoud; Kuruvinashetti, M. S.; Patil, B. V. Genetic relatedness among *Helicoverpa armigera* (Hübner) occurring on different host plants as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2006**, 9, 227-233.
17. Ahmad, M.; Arif, M. I.; Ahmad, Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. *Crop. Prot.* **2003**, 22, 539–544.
18. Ammouneh, H.; Harba, M.; Idris, E.; Makee, H. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal. *Turkish J. Agric. For.* **2011**, 35, 421–431.
19. Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S. S.; Soberón, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, 41, 423–31.
20. Bobrowski, V. L.; Fiuza, L. M.; Pasquali, G.; Bodanese-zanettini, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis* : uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Cienc. Rural* **2003**, 34, 843–850.
21. Polanczyk, R. A.; Alves, S. B. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociencia*. **2003**, 7, 1-10.
22. Glare, T. R., O'Callaghan, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety, 1rd ed.; Publisher: John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, 2000; pp. 350.
23. Karim, S.; Riazuddin, S., Gould, F.; Dean, D. H. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2000**, 67, 198–216.
24. Van Frankenhuyzen, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* **2009**, 101, 1-16.

25. Chandrashekar, K.; Kumari, A.; Kalia, V.; Gujar, G. T. Baseline susceptibility of the American bollworm, *Helicoverpa armeira* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* Berl. var. *kurstaki* and its endotoxins in India. *Curr. Sci.* **2005**, *88*, 167–175.
26. Liao, C.; Heckel, D. G.; Akhurst, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *J. Invertebr. Pathol.* **2002**, *80*, 55–63.
27. Agaisse, H.; Lereclus, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 6027–6032.
28. Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R. M.; Capell, T.; Christou, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* **2011**, *9*, 283–300.
29. Rausell, C.; Martínez-Ramírez, A. C.; García-Robles, I.; Real, M. D. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1553–1558.
30. Ibargutxi, M. A.; Muñoz, D.; Escudero, I. R. D.; Caballero, P. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biol Control.* **2008**, *47*, 89–96.
31. Chakrabarti, S. K.; Mandaokar, A.; Kumar, P. A.; Sharma, R. P. Efficacy of lepidopteran specific - endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* **1998**, *72*, 336–337.
32. Bird, L. J.; Akhurst, R. J. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, *94*, 84–94.
33. Martínez, C.; Ibarra, J. E.; Caballero, P. Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. *J. Invertebr. Pathol.* **2005**, *90*, 91–7.
34. Morse, R. J.; Yamamoto, T.; Stroud, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure.* **2001**, *9*, 409–417.
35. Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Moar, W. J., & Smith, R. A. (1998). Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1385–1389.
36. Herbert, D. A.; Harper, J. D. Bioassay of δ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Heliothis zea* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **1985**, *46*, 247–250.

37. Ali, A.; Young, S. Y. Activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against different ages and different stages of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. *J. Entomol. Sci.* **1996**, *31*, 1–8.
38. James, R. R.; Croft, B. A.; Strauss, S. H. Susceptibility of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to different strains and transgenic toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* **1999**, *28*:108–115.
39. Li, H.; Bouwer, G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, *109*, 110–6.
40. McGaughey, W. H. Effects of larval age on the susceptibility of almond moths and indian meal moths to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **1978**, *71*, 923–925.
41. Nwanze, K. F.; Partida, G. J.; McGaughey, W. H. 1975. Susceptibility of *Cadra cautella* and *Plodia interpunctella* to *Bacillus thuringiensis* on wheat. *J. Econ. Entomol.* **1975**, *68*, 751–752.
42. Cooper, D. J. The application of a model to achieve predicted mortality in a field trial using *Bacillus thuringiensis* to control *Heliothis punctigera*. *Entomol. Exp. Appl.* **1984**, *36*, 253–259.
43. Avilla, C.; Vargas-Osuna, E.; González-Cabrera, J.; Ferré, J.; González-Zamora, J. E. Toxicity of several delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *J. Invertebr. Pathol.* **2005**, *90*, 51–4.
44. Keller, M.; Sneh, B.; Strizhov, N.; Prudovsky, E.; Regev, A.; Koncz, C.; Schell, J.; Zilberstein, A. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1996**, *26*, 365–373.
45. Lorence, A.; Darszon, A.; Dí'az, C.; Lie'vano, A.; Quintero, R.; Bravo, A. d-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membrane vesicles in suspension and in planar lipid bilayers. *Febs Lett.* **1995**, *360*, 217–222.
46. Ingle, S. S.; Shah, M. P.; Vaidya, A.; Chhatpar H. S.; Rao K. K. Effect of d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on midgut of *Helicoverpa armigera*. *Ind J Exp Biol.* **1997**, *35*, 83–85
47. Downes, S.; Mahon, R. Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia. *GM Crops Food.* **2012**, *3*, 228–234.
48. Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ Entomol.* **1976**, *69*, 487-488.
49. Beegle, C.C. Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In: Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*, 1st ed.; Hickle, L. A., Fitch, W. L. Eds.; American Chemical Society: Washington DC, United States of America, 1989, pp.14–21.

50. Ferré, J.; Real, M. D.; Van Rie, J.; Jansens, S.; Peferoen, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 5119–23.
51. Abbott, W. S. Classic paper : abbot 's formula a method of computing the effectiveness of an insecticidel. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **1925**, *3*, 265–267.
52. SAS Institute. User's guide: statistics, version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, 2002.

Capítulo 3 - Suscetibilidade de duas populações brasileiras de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium rileyi* e *Metarhizium anisopliae*.

Resumo: A pesquisa objetivou analisar a suscetibilidade de duas populações de *Helicoverpa armigera* aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *M. rileyi*. As populações de *H. armigera* foram coletadas em cultivos de soja oriundos dos municípios de Rio Verde (GO) e Luís Eduardo Magalhães (BA), sendo conduzidas ao laboratório e mantidas em dieta artificial até a décima geração. Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram obtidos a partir dos produtos comerciais biológicos Boveril[®] PM e Metarril[®] PM, respectivamente, enquanto que *M. rileyi* foi isolado de cadáveres de *H. armigera*, sendo padronizados na concentração de 10^8 conídios viáveis/mL. Os bioensaios foram conduzidos em recipientes esféricos de plástico (2 cm de diâmetro x 3 cm de altura), sendo vertido dieta artificial de criação até completar 1 cm de altura. Após este processo foi realizada a imersão das lagartas de 1^o instar na solução do fungo entomopatogênicos. Em cada recipiente foi inserida uma lagarta de primeiro instar, com menos de 24 h de vida, totalizando 100 lagartas por tratamento, distribuídas em 10 repetições. As avaliações foram efetuadas a cada 24 h, até o decimo dia da confecção do bioensaio. Com relação à população de *H. armigera* coletada no município de Rio Verde, o fungo *M. rileyi* causou 56% de mortalidade em lagartas de primeiro instar, diferindo significativamente quando comparado com *B. bassiana*, com 34% de mortalidade. Para a população de Luís Eduardo Magalhães, a maior mortalidade de lagartas de *H. armigera* também foi observada para o tratamento com *M. rileyi*, porém não foi significativo em relação aos demais micro-organismos. O fungo entomopatogênico *M. rileyi* ocasionou maior mortalidade em lagartas de primeiro instar de *H. armigera* quando comparado com os demais entomopatógenos, apresentando, porém, baixa eficiência de controle para com a referida praga.

1. Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga mundial que se alimenta de mais de 300 espécies de plantas e desenvolveu resistência a inseticidas químicos e biológicos (Wang, 2010) sendo conhecida por ser a praga mais adaptável em todo o mundo (Rajapakse, 2007), é responsável por grandes perdas econômicas em todo o mundo (Chougule et al., 2005; Sekulic et al., 2004; Ignacimuthu & Jayaraj, 2003), devido ao seu hábito polífago, alta mobilidade dos adultos (2.000 km) (Nibouche et al. 1998), fecundidade e diapausa facultativa e ampla distribuição geográfica são as características fisiológicas importantes que facilitam a sobrevivência de *H. armigera* mesmo em habitats adversos (Guoqing et al., 2001; Guo, 1997; Zalucki et al., 1986; Fitt, 1989).

Sua alta capacidade de migração pode ocasionar a formação de diferentes populações de *H. armigera* podem se formar devido ao isolamento geográfico, com consequente isolamento reprodutivo, originando populações fisiologicamente diferentes. Estas diferenças fisiológicas podem influenciar na suscetibilidade às diversas táticas de controle o que implicaria na necessidade de elaboração de sistemas de manejo de acordo com a variabilidade populacional. Essa variação de resposta pode ocorrer para entomopatógenos conforme observado para populações de *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda* oriundas de países da América Latina, Europa e de diferentes estados brasileiros (Monnerat et al., 2006; Polanczyk et al., 2005; Gonzáles-Cabrera et al., 2001).

Devido a uma longa história de uso de inseticidas no controle desta praga, populações de *H. armigera* gradualmente tornaram-se resistentes a muitos inseticidas, incluindo fipronil, chlorfenapyr, spinosad e indoxacarb (Ahmad et al. 2003; Wu 2007). Este fato aliado a ausência de plantas resistentes e a falta de medidas de controle adequadas a *H. armigera* torna difícil controlar de forma satisfatória esse inseto no campo (Chougule et al. 2005).

Os relatos de rápida evolução da resistência em populações desta espécie e o aumento da cobrança por parte do público consumidor por uma produção de alimentos mais saudável e sustentável tem levado os agricultores a buscar medidas alternativas aos agrotóxicos. Fungos entomopatogênicos têm grande potencial como

agentes de controle de insetos-praga e são um componente importante dentro de sistemas integrados de manejo de pragas (Kaur & Padmaja, 2008; Peng et al. 2008; Thungrabeab & Tongma, 2007; Coates et al. 2002). Diversos fungos entomopatogênicos, como *Lecanicillium sp.* (Ownley et al. 2010; Jung et al. 2006), *Beauveria bassiana* (Quesada-Moraga et al. 2006; Chandler & Davidson, 2005) e *Metarhizium anisopliae* (Sahayaraj & Francis Borgio, 2010; Dong et al. 2007) são utilizados para controlar hemípteros, lepidópteros e coleópteros.

H. armigera uma praga recentemente encontrada no Brasil (Czepak et al., 2013) o manejo desta praga ainda se encontra em fase inicial, portanto é imprescindível estudos que avaliem a suscetibilidade de *H. armigera* a agentes de controle microbiano considerando a possível variabilidade populacional. Desta forma este projeto tem como objetivo verificar a suscetibilidade de duas populações distintas de *H. armigera* a isolados e de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium rileyi* e *Metarhizium anisopliae*.

2. Materiais e métodos

Dois populações de *H. armigera*, provenientes dos municípios de Rio Verde (GO) e Luís Eduardo Magalhães (BA), coletadas na cultura da soja (*Glycine max* L.), foram utilizadas nos bioensaios. Cem lagartas das duas populações foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas (MG), Núcleo de Biologia Aplicada, Área de Pesquisa em Controle Biológico, sob coordenação do Dr. Fernando Hercos Valicente.

Os insetos foram identificados e criados em laboratório, sendo realizada a criação massal por 10 gerações, para posterior realização dos bioensaios. Para a criação foi utilizada uma dieta artificial proposta por GREENE et al. (1976) com a adição de uma solução vitamínica (ácido fólico: 0,125 g; biotina: 0,01 mg; vitamina B12: 0,001 g; vitamina B6: 0,125 g; vitamina B2: 0,25 g; vitamina B1: 0,125 g; vitamina B5: 0,5 g; e vitamina B3: 0,5 g) diluída em 100 mL de água estéril.

2.1. Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos.

Foram utilizados dois formulados comerciais a base de fungos entomopatogênicos, Boveril® WP, $5,0 \times 10^8$ conídios viáveis por grama, Itaforte Bio Produtos (*Beauveria bassiana*) e Metarril® WP, $5,0 \times 10^8$ conídios viáveis por grama, Itaforte Bio Produtos (*Metarhizium anisopliae*). Os formulados comerciais foram diluídos em água destilada estéril e a concentração ajustada a 10^8 conídios/mL, com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico, de acordo com a especificação do fabricante. Também foi testado um isolado de *Metarhizium rileyi* encontrado em cadáveres de *H. armigera*. O isolado foi replicado em pacas de petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar), após 15 dias de crescimento o fungo foi raspado do meio de cultura com o auxílio de uma alça de platina e colocado em água destilada estéril e a concentração ajustada a 10^8 conídios/mL.

Os ensaios foram realizados em recipientes plásticos esféricos, do tipo brilho labial, com 2 cm de diâmetro e 3 cm de altura. Em cada recipiente plástico foi vertido dieta de criação até completar 1 cm de altura. Após a secagem da dieta foi inserida uma lagarta de primeiro ínstar com menos de 24 h de vida, que antes de serem acondicionadas nos recipientes foram imersas por 5 segundos na solução do produto na concentração 10^8 conídios/mL. Após a evaporação do excesso de umidade, 100 lagartas de primeiro ínstar foram acondicionadas individualmente por tratamento, em que, cada conjunto de 10 lagartas representou uma repetição.

O mesmo procedimento foi realizado para a testemunha, mas utilizando somente água destilada estéril para a imersão das lagartas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 10 repetições, sendo conduzido em sala climatizada ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h) e avaliados diariamente até o décimo dia. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente, determinando a mortalidade e o tempo letal médio (TL₅₀), para a análise da TL₅₀ serão considerados apenas os formulados que apresentaram mortalidade superior a 80%. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Mini-Tab. A TL₅₀ será determinada através do programa Mini-Tab.

2.2. Efeito Subletal

Com o objetivo de observar possíveis efeitos subletais nos insetos sobreviventes nos testes de patogenicidade, foi realizada a pesagem das pupas dos tratamentos, e da testemunha. A pesagem de pupas foi realizada em balança analítica devidamente calibrada. Os insetos foram individualizados em recipientes plásticos similares aos utilizados para criação de *H. armigera*, e foi realizada a sexagem para determinar a proporção de machos e fêmeas. Após a emergência foram montadas gaiolas com dois casais de adultos sobreviventes que foram usados para avaliar a oviposição, viabilidade dos ovos e longevidade. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Mini-Tab.

3. Resultados

3.1. Mortalidade de neonatas de *H. armigera* aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*.

Nos bioensaios de mortalidade utilizando os fungos entomopatogênicos as lagartas da população proveniente do município de Rio Verde apresentaram mortalidade de 34 % para o fungo *B. bassiana*, apresentando diferença significativa para os tratamentos controle e *M. rileyi*. A mortalidade foi igual a 39% para *M. anisopliae* que apresentou diferença significativa apenas para o tratamento controle, e para o fungo *M. rileyi* a mortalidade foi de 56% não mostrando diferença significativa para o tratamento com *M. anisopliae* (Fig. 1).

Figura 1. Mortalidade média (%) de neonatas de *Helicoverpa armigera* provenientes do município de Rio Verde – GO submetidas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*. Colunas representadas por cada tratamento, seguida de mesma não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A barra de erro representa o erro padrão (\pm EP)

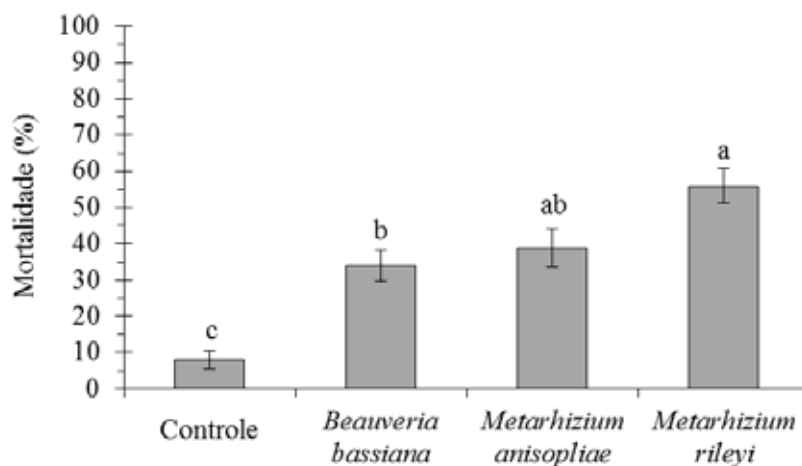
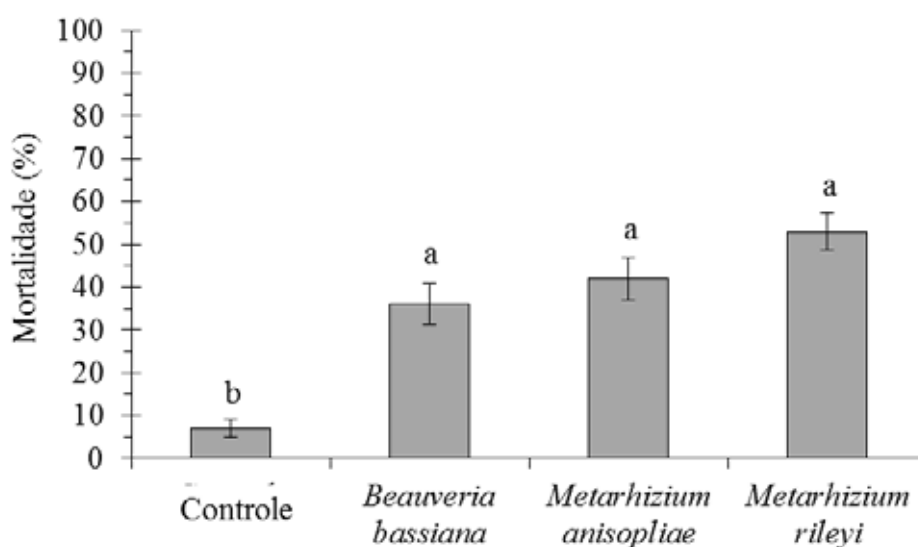


Figura 2. Mortalidade média (%) de neonatas de *Helicoverpa armigera* provenientes do município de Luís Eduardo Magalhães – BA submetidas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*. Colunas representadas por cada tratamento, seguida de mesma não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A barra de erro representa o erro padrão (\pm EP)



Na população vinda do município de Luís Eduardo Magalhães os tratamentos com *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. rileyi* apresentaram mortalidade igual a 36,00%, 42% e 53% respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, porem todos se diferenciaram significativamente da testemunha que apresentou uma mortalidade de 7% (Fig. 2)

3.2. Efeitos subletais nos insetos provenientes da cidade de Rio Verde sobreviventes nos testes de patogenicidade.

De maneira geral o período larval das lagartas submetidas aos tratamentos com os fungos entomopatogênicos mostrou-se ligeiramente maior do que o período larval do controle (Tabela 1). O período larval das lagartas da testemunha da população de Rio Verde foi em média de 16,20 dias, diferenciando significativamente dos demais tratamentos. As lagartas desta população tratadas com *B. bassiana* apresentaram um período larval médio de 20,47, com diferença significativa para *M. anisopliae* e *M. rileyi*. O período larval médio de lagartas tratadas com o fungo *M. anisopliae* foi de 21,07 dias, diferindo significativamente apenas do tratamento controle. O tratamento com *M. rileyi* não se diferenciou do tratamento com *M. anisopliae* e apresentou período larval de $21,57 \pm 0,24$ dias (Tab. 1).

As pupas das lagartas sobreviventes dos tratamentos com *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram respectivamente peso de $0,297 \pm 0,001$ e $0,298 \pm 0,001$ gramas, se diferenciando significativamente dos tratamentos controle e do tratamento com *M. rileyi* (Tab. 1).

As pupas provenientes das lagartas submetidas ao fungo *M. rileyi* pesaram em média $0,287 \pm 0,004$ gramas, estatisticamente diferentes dos demais tratamentos (Tabela 1).

O número de ovos por fêmea não apresentou diferença significativa nos tratamentos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. rileyi* em qual cada fêmea ovipositou em média respectivamente $169,80 \pm 9,82$, $147,40 \pm 22,05$ e $166,40 \pm 20,93$ ovos, todos os tratamentos se diferenciaram do tratamento controle no qual as fêmeas ovipositaram $354,60 \pm 15,95$ ovos (Tab. 1).

Tabela 1. Período larval, peso de pupa fecundidade e fertilidade dos sobreviventes de *H. armigera* oriundos do município de Rio Verde submetidos ao tratamento com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*.

Colunas representadas por cada tratamento, seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tratamento	Período Larval (dias)	Peso de Pupa (g)	Fecundidade (n° ovos/fêmea)	Fertilidade (%)
Controle	16,20 ± 0,15 c	0,331 ± 0,001 a	354,60 ± 15,95 a	72,40 ± 2,91 a
<i>Beauveria bassiana</i>	20,47 ± 0,31 b	0,297 ± 0,001 b	169,80 ± 9,82 b	53,40 ± 2,40 b
<i>Metarhizium anisopliae</i>	21,07 ± 0,19 ab	0,298 ± 0,001 b	147,40 ± 22,05 b	51,60 ± 3,26 b
<i>Metarhizium rileyi</i>	21,57 ± 0,24 a	0,287 ± 0,004 c	166,40 ± 20,93 b	48,60 ± 2,87 b
F	113,75	92,34	29,64	14,03
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Os ovos das fêmeas provenientes do tratamento controle apresentaram maior fertilidade com 72,40 ± 2,91%, diferenciando significativamente dos demais tratamentos que obtiveram uma porcentagem de fertilidade de 53,40 ± 2,40% para o fungo *B. bassiana*, 51,60 ± 2,40% para *M. anisopliae* e uma fertilidade de 48,60 ± 2,87% para *M. rileyi* (Tab. 1).

3.3. Efeitos subletais nos insetos provenientes da cidade de Luís Eduardo Magalhães sobreviventes nos testes de patogenicidade.

O período larval das lagartas submetidas aos tratamentos com os fungos entomopatogênicos foi maior quando comparado com o controle, os tratamentos com os fungos não se diferenciaram entre si, mas diferenciaram significativamente do controle.

Os tratamentos com os fungos entomopatogênicos não se diferenciaram entre si em relação ao peso das pupas, apenas o tratamento controle com peso de 0,326 ± 0,001 gramas apresentou diferença significativa (Tabela 2). O mesmo aconteceu para a fecundidade dos ovos, apenas o tratamento controle apresentou diferença significativa para os demais tratamentos, apresentando um número médio de ovos por fêmea de 384,20 ± 13,84 para o tratamento controle, 167,00 ± 17,18 para o tratamento com *B. bassiana*, 163,20 ± 20,63 para *M. anisopliae* e 137,40 ± 24,58 para *M. rileyi* (Tabela 2).

Na avaliação da fertilidade dos ovos o tratamento *B. bassiana* apresentou 48,40 ± 4,17% de fertilidade, *M. anisopliae* apresentou 45,40 ± 3,01% de fertilidade e

53,60 ± 4,27% para *M. rileyi* os três tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Período larval, peso de pupa fecundidade e fertilidade dos sobreviventes de *H. armigera* oriundos do município de Luís Eduardo Magalhães submetidos ao tratamento com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi*. Colunas representadas por cada tratamento, seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tratamento	Período Larval (dias)	Peso de Pupa (g)	Fecundidade (n° ovos/fêmea)	Fertilidade (%)
Controle	15,53 ± 0,17 b	0,326 ± 0,001 a	384,20 ± 13,84 a	77,80 ± 3,06 a
<i>Beauveria bassiana</i>	21,37 ± 0,56 a	0,295 ± 0,001 b	167,00 ± 17,18 b	48,40 ± 4,17 b
<i>Metarhizium anisopliae</i>	19,90 ± 0,80 a	0,295 ± 0,002 b	163,20 ± 20,63 b	45,40 ± 3,01 b
<i>Metarhizium rileyi</i>	20,12 ± 0,27 a	0,294 ± 0,003 b	137,40 ± 24,58 b	53,60 ± 4,27 b
F	24,29	63,41	34,84	16,02
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

4. Discussão

Os resultados mostram que os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* são patogênicos para lagartas de *Helicoverpa armigera*. Os fungos entomopatogênicos têm grande potencial para o controle de pragas de insetos lepidópteros (Vega-Aquino et al., 2010), porém as cepas dos fungos utilizados não mostraram resultados satisfatórios no controle dos primeiros estágios larvais. Trabalhos com bioensaios demonstram a eficácia de fungos entomopatogênicos contra vários estágios larvais de *H. armigera* (Nguyen et al. 2007; Wakil et al., 2013) estes resultados vão contra os resultados obtidos neste trabalho.

De maneira geral os trabalhos que testam a mortalidade de lepidópteros com fungos demonstram uma maior mortalidade nos primeiros ínstares larvais, com a mortalidade apresentando uma queda nos últimos estágios (Hafez et al., 1997, Inglis et al., 2001). Os diferentes estágios de desenvolvimento de insetos mostram variação na sua susceptibilidade à infecção por fungos entomopatogênicos. Isto pode ser devido ao aumento de melanina na cutícula que impede a penetração do

tubo de germe de fungos (Wilson et al., 2001). A concentração utilizada de cada patógeno também é fator determinante para a mortalidade dos insetos (Koppenhöfer, Kaya, 1997; Malakar et al., 1999; Wraight, Ramos, 2005).

Na relação patógeno-hospedeiro, o processo de infecção inicia-se pela adesão da estrutura reprodutiva do fungo na cutícula do inseto, podendo ser específico ou não específico (Fargues, 1984). Para *B. bassiana* e *M. anisopliae* este mecanismo não é específico, sendo relacionado à camada hidrofóbica presente na superfície destas estruturas (Mozes, Rouxhet, 1987; Boucias et al., 1988). Além deste mecanismo, existem complexos específicos representados por substâncias químicas secretadas por fungos entomopatogênicos, que são responsáveis por facilitar a adesão das estruturas reprodutivas na cutícula do inseto (Boucias et al., 1988), fatores que podem ter influenciado na baixa mortalidade de *H. armigera*.

Além destes mecanismos, a reduzida capacidade do entomopatógeno em utilizar os nutrientes disponíveis na superfície da cutícula do inseto para seu desenvolvimento e a ausência de características necessárias para o reconhecimento de um hospedeiro suscetível ou do local de infecção penetrável são importantes fatores para a ausência ou reduzida infecção de um fungo entomopatogênico em relação à determinada espécie de inseto (Hajek, St. Leger, 1994).

Durante o processo germinativo, à velocidade pela qual a estrutura reprodutiva do fungo consegue penetrar na cutícula do inseto pode ser dependente do isolado utilizado, das condições ambientais, da espessura da cutícula do inseto, do passado térmico das estruturas reprodutivas, da densidade do conídio e da variedade de enzimas extracelulares sintetizadas por fungos entomopatogênicos responsáveis pela degradação da cutícula (David, 1967; St. Leger et al., 1986; Paterson et al., 1994; Alves, 1998; Hajek et al., 2002). O fungo pode demorar até três dias para penetrar na cutícula do inseto (Moino Junior et al., 2002).

A mortalidade significativa observada pode estar relacionada à penetração fúngica no tegumento do inseto através da combinação dos processos de pressão mecânica e ação enzimática (Goettel et al., 1989; El-Sayed et al., 1991; Arruda et al., 2005). As enzimas sintetizadas pelos fungos entomopatogênicos, responsáveis pela degradação da maioria dos componentes da cutícula dos insetos, são compostas principalmente por proteases, quitinases e esterases (Charnley, St.

Leger, 1991), com variabilidade quanto à composição em relação à espécie e/ou isolado do entomopatógeno, que pode ter sido um importante fator na mortalidade de *H. armigera*. Devi et al. (2003) também relata, através de bioensaios, uma menor susceptibilidade de *H. armigera* ao fungo *M. rileyi*, quando comparada com outras espécies de lepidópteras como *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Porém essa variação na susceptibilidade pode estar ligada a virulência das cepas testadas (Ignoffo, Garcia, 1985; Prasad, et al., 1989).

A mortalidade causada pelos fungos entomopatogênicos é dependente de fatores limitantes como componentes nutricionais da cutícula, reações químicas e ação de micotoxinas (Smith, Grula, 1982; Kerwin, 1984; Li et al., 2012), com importância em relação a virulência de determinado entomopatógeno (Zhang et al., 2008). A baixa mortalidade de *H. armigera* obtida nos bioensaios podem sugerir um grau de resistência das populações brasileiras as cepa utilizadas no estudo, pois *H. armigera* apresenta um alto grau de adaptação. Há vários relatos de resistência desse inseto a diversos inseticidas em todo o mundo (Kranthi et al., 2002; Wyckhuys et al. 2013) mostra que em um estudo onde foram incluídos 30 espécies de artrópodes pragas, com importância agrícola, onde todos apresentam alta incidência de resistência a inseticidas, *H. armigera* se destaca apresentando 640 casos de resistência, ficando bem a frente de insetos como *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Além da facilidade de desenvolver resistência *H. armigera* apresenta uma alta imunidade inata nas larvas que respondem tanto nos níveis celular e humoral contra agentes patogênicos (Wang et al, 2013). A imunidade inata de *H. armigera* possui plasmatócitos capaz formar uma massa de cápsulas em torno de corpos estranhos e hemócitos granulares fagocitam patógenos estranhos, este sistema imune dificulta a entrada de patógenos como, fungos, bactérias e vírus no sistema da lagarta (Wang et al, 2013; Ribeiro, Brehélin, 2006). Alves, (2008) relata que conídios e micélios do fungo *M. rileyi* são reconhecidos pelo sistema imune dos insetos, dificultando assim sua colonização.

No presente estudo, os múltiplos efeitos subletais dos fungos entomopatogênicos foram encontrados nas lagartas sobreviventes e nos adultos de *H. armigera*. Em geral, houve pouca diferença nos efeitos causados pelos fungos *B.*

bassiana, *M. anisopliae* e *M. rileyi*. Os efeitos negativos no desenvolvimento dos insetos resultou em redução no tamanho das lagartas, bem como o potencial reprodutivo. Da mesma forma, Hafez et al. (1997) documentaram diferentes efeitos subletais em *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), tratadas com *B. bassiana*. Redução na longevidade e fecundidade de traça das cruxíferas, *P. xylostella*, devido ao tratamento inseticida também foi documentada por Kumar e Chapman (2006).

O menor peso encontrado nas pupas é provavelmente parte de uma resposta imune das lagartas infectadas pelos fungos, que podem consumir nutrientes, suprimir a defesa, ou afetar a função vital dos insetos (Clarkson, Charnley, 1996), sendo relatada a redução na alimentação em alguns insetos infectados por fungos, (Hornbostel et al., 2004; Hajek e St. Leger, 1994). O inseto hospedeiro apresenta diversos tipos de reações imunes, humoral e celular, contra o fungo (Vey and Götz, 1986), mas o patógeno pode superá-los através de uma combinação de eventos, incluindo danos mecânicos por um crescimento de hifas e produção de toxinas (Inglis et al., 2001). A um nível subletal, qualquer destes processos em conjunto com o esgotamento de nutrientes causado pelo crescimento do fungo pode direta ou indiretamente afetar o hospedeiro (Quesada-Moraga et al., 2004).

Sharma et al. (1994) estudou as alterações fisiológicas em lagartas de *H. armigera* tratadas com *B. bassiana* e descobriram que as toxinas presentes no fungos destruíram o equilíbrio normal do sistema fisiológico dos insetos, reduzindo a eficiência respiratória o que permitiu o acúmulo de carboidratos. Eles também demonstraram que metabolitos tóxicos desempenham um papel importante na redução de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Deficiência nutricional e toxinas, atuando isoladamente ou em conjunto, pode afetar drasticamente o desenvolvimento de um inseto, especialmente em processos críticos, tais como reprodução e muda que têm uma alta demanda energética.

Efeitos inibidores tais como a redução da fecundidade e fecundidade dos ovos indica sucesso na invasão do fungo no inseto hospedeiro. Há uma possível ligação entre a infecção e os efeitos subletais, como a capacidade reprodutiva dos adultos, como sugerido por Mulock e Chandler (2001). Daniels et al. (1996) relata

que o único fator entre sucesso e o fracasso na reprodução por *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). foi o tamanho do corpo das fêmeas.

No entanto, existem poucos estudos conclusivos disponíveis sobre os efeitos subletais de fungos em potencial reprodutivo de insetos. Por isso, pode-se levantar a hipótese de que as larvas infectadas por fungos pode ter adquirido e armazenado recursos de nutrientes menores do que a de larvas do tratamento controle, podendo afetar a fecundidade das fêmeas.

5. Conclusão

Os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. rileyi* são patogênicos para *H. armigera*. O fungo entomopatogênico *M. rileyi* ocasionou maior mortalidade em lagartas de primeiro instar de *H. armigera* quando comparado com os demais entomopatógenos, apresentando, porém, baixa eficiência de controle para com a referida praga.

6. Referências

Ahmad M.; Iqbal A. M.; Ahmad, Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. *Crop Protection*, v.22, p.539-544, 2003.

Alves, S.B.; Lecuona, R.E. Epizootologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves, S.B. (Org.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba- SP: FEALQ, 1998. p. 97-170.

Arruda, W.; Lubeck, I.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, v.37, p.231-244, 2005.

Boucias, D. G.; Pendland, J. C.; Latge, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, n.7, p.1795-1805, 1988. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202748/pdf/aem00112-0161.pdf>> 24 Jan. 2013.

C.N.K. Rajapakse, G.H. Walter Polyphagy and primary host plants: oviposition preference versus larval performance in the lepidopteran pest *Helicoverpa armigera* *Arthropod–Plant Interact.*, 1 (2007), pp. 17–26

Chandler, D.; Davidson, G. Evaluation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against soil-dwelling stages of cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) in

glasshouse and field experiments and effect of fungicides on fungal activity. *J Econ Entomol* 98: 1856-1862, 2005.

Chougule, N. P.; Giri, A. P.; Sainani, M. N.; Gupta, V. S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.35, p 355–367, 2005

Clarkson, J. M., and A. K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* 4: 197Ð203.

Coates, B. S.; Hellmich R. L.; Lewis L. C. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycotina: Hyphocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome*, 45:1:125-132, 2002

Czepak, C.; albernaz, K. C.; Vivan, L. M.; Guimarães, H. O.; Carvalhais, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 43, n.1, p. 110-113, jan./mar. 2013.

David, W.A.L. The physiology of the insect integument in relation to the invasion of pathogens. In: Beament, J.W.L.; Treherne, J.E. (Org.). *Insects and physiology*. London: Oliver & Boyd, 1967. p. 17-35.

Devi, P. V., Prasad, Y. G., Chowdary, D. A., Rao, L. M., & Balakrishnan, K. (2003). Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F)

Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Mycopathologia*, 156(4), 365-373.

Daniels, T. J., R. C. Falco, K. L. Curran, and D. Fish. 1996. Timing of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) oviposition and larval activity in southern New York. *J. Med. Entomol.* 33: 140-147.

Dong, C., Zhang, J., Chen, W., Huang, H., Hu, Y. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. *Microbiological Research* 162: 53-61, 2007.

El-Sayed, G.N.; Ignoffo, C.M.; Leathers, T.D. Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*, v.113, n.2, p.95-102, 1991.

Fargues, J. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Aist, J.; Roberts, D. W. (Org.). *Infection process of fungi*. Bellagio: Rockefeller Foundation Study Center, 1984. p. 90-110.

G.P. Fitt The ecology of *Heliothis* species in relation to agro ecosystems *Annu. Rev. Entomol.*, 34 (1989), pp. 17-52

Goettel, M.S.; Leger, R.J.S.; Rizzo, N.W.; Staples, R.C.; Roberts, D.W. Ultra-structural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology*, v.135, p.2233-2239, 1989.

González-Cabrera, J.; Herrero, S.; Sayyed, A. H.; Escriche, B.; Liu, Y.B.; Meyer, S. K.; Wright, D.J.; Tabashnik, B.E.; Ferre J. Variation in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.4610-4613, 2001

Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

Guo, Y. Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. *Acta Entomologica Sinica*, Beijing, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1997.

Guoqing, L.; Zhaojun, H.; Lili, M.; Xiaoran, Q.;Changkun, C.; Yinchang, W. Natural oviposition-deterrent chemicals in female cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Journal of Insect Pathology*, New York, v. 47, n. 9, p. 951-956, 2001.

Ignoffo CM, Garcia C. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. *J Invertebr Pathol* 1985; 45: 346–352.

Hajek, A. E.; St. Leger, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, v.39, p.293-322, 1994.

Hajek, A.E.; Davis, C.I.; Eastburn, C.C.; Vermeulen, F.M. Deposition and germination of conidia of the entomopathogen *Entomophaga maimaiga* infecting larvae of gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.79, n. 1, p.37-43, 2002.

Hornbostel, V. L., Ostfeld, R. S., Zhioua, E., & Benjamin, M. A. (2004). Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 41(5), 922-929.

Ignacimuthu, S.; Jayaraj, S. Ecofriendly approaches for sustainable pest management *Curr. Sci.*, 84 (2003), pp. 10–25

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential* (pp.23–69). Wallingford, UK: CABI Publishing.

Jung, H.S., Lee, H.B., Kim, K., Lee E.Y., 2006 Selection of *Lecanillium* strains for aphid (*Myzus persicae*) control. *The Korean Journal of Mycology* 34: 112-118.

Kaur, G., Padmaja, V. 2008. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera; Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR, *African journal of Microbiology Research*, 2:299-307.

Kerwin, J.L. Fatty acid regulation of the germination of *Erynia variabilis* conidia on adults and puparia of the lesser housefly, *Fanni canicularis*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.30, p.158-161, 1984.

Koppenhöfer, A. M.; KAYA, H. K. Additive and synergist Interaction between Entomopathogenic Nematodes and *Bacillus thuringiensis* for Scarab Grub Control. *Biological Control*, Orlando, v. 8, p. 131-137, 1997

Kranthi KR, DR Jadhav, S Kranthi, R R Wanjari, SS Ali and DA Russell (2002). Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Prot.*, 21:449-460.

Kumar, K. and Chapman, R. B. 2006. Sublethal effects of insecticides on the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Science*, 15: 344-352.

Li, Y.; Zhao, P.; Liu, S.; Dong, Z.; Chen, J.; Xiang, Z.; Xia, Q. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.42, p.766-775, 2012.

Malakar, R., Elkinton, J. S., Hajek, A. E., & Burand, J. P. (1999). Within-Host Interactions of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis Virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of invertebrate pathology*, 73(1), 91-100.

Moino Junior, A.; Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Neves, P.M.O.J.; Pereira, R.M.; Vieira, S.A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and

Metarhizium anisopliae in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola*, v.59, n.2, p.212-219, 2002.

Monnerat, R. G.; Queiroz, P.; Orduz, S.; Benitende, G.; Cozzi, J.; Real, M. D.; Ibarra, J.; Bravo, A. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7029-7035, 2006.

Mozes, N.; Rouxhet, P. G. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v.6, p.99-112. 1987. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167701287900583>> 24 Jan. 2013. doi: 10.1016/0167-7012(87)90058-3

Mulock, B. S. and Chandler, L. D. 2001. Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of western corn rootworm, *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *BioControl*, 22: 16-21.

Nibouche S, Bues R, Toubon JF, Poitout S (1998) Allozyme polymorphisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. *Heredity* 80: 438–445

Nguyen, T. H. N., Borgemeister, C., Poehling, H., & Zimmermann, G. (2007). Laboratory investigations on the potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 853–864.

Ownley, B.H., Gwinn K.D., Vega F.E., 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55:113-128.

Paterson, I.C.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M.; Clarkson, J.M. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology*, v.140, p.3153-3159, 1994

Peng, G.; Wang, Z.; Yin, Y.; Zeng, D.; Xia, Y. X. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Prot* 27:1244–1250, 2008

Prasad VD, Jayaraj S, Rabindra RJ. Susceptibility of the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* to certain entomogenous fungi. *J Biol Control* 1989; 3: 53–55.

Polanczyk, R. A.; Alves, S. B.; Padulla, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biopesticides International*, v. 1, n. 1/2, p. 114-124, 2005.

Quesada-moraga, E.; Maranhão, E. A. A.; Valverde-Garcia, P.; Santiago-Alvarez, C. 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* 36: 247-287, 2006

Quesada-Moraga, E., Santos-Quirós, R., Valverde-García, P., & Santiago-Alvarez, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of invertebrate pathology*, 87(1), 51-58, 2004.

Ribeiro C, Brehélin M: Insect haemocytes: what type of cell is that?. J Insect Physiol 2006, 52:417-29.

Sahayaraj, K., Francis, Borgio, J. Virulence of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Metsch.) Sorokin on seven insect pests. Indian Journal of Agricultural Research 44: 195-200, 2010.

Sekulic, R.; Tatjana, K.; Masirevic, S.; Vajgand, D.; Gordana, F.; Radojcic, S. Incidence and damage of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hbn.) in Vojvodina Province in 2003 Biljni Lekar Plant Doctor, 32 (2004), pp. 113–124

Sharma S, Agarwal GP, Rajak RC. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Indian J Exp Biol 1994; 32: 168–171.

Smith, R.J.; Grula, E.A. Toxic components on the larval surface of the corn leafworm *Heliothis zea* and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, v.39, n.1, p.15-22, 1982.

St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. Journal of Invertebrate Pathology, v.48, n.1, p.85-95, 1986.
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022201186901461>> 27 Jan. 2013.
doi: 10.1016/0022-2011(86)90146-1

Vega-Aquino, P., Sanchez-Peña, S., & Blanco, C. A. (2010). Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 145–149.

Wakil, W., Ghazanfar, M. U., Riasat, T., Qayyum, M. A., Ahmed, S., & Yasin, M. (2013). Effects of interactions among *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis* and chlorantraniliprole on the mortality and pupation of six geographically distinct *Helicoverpa armigera* field populations. *Phytoparasitica*, 41(2), 221-234.

Wang, Q., Liu, Y., He, H. J., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2010). Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. *BMC immunology*, 11(1), 9.

Vey, A., Goetz, P., 1986. Antifungal cellular defense mechanisms in insects. In: Gupta, A.P. (Ed.), *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*. Wiley, New York, pp. 89–115.

Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F., & Pell, J. K. (2001). Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4, 637–649.

Wu, K. M. Regional management strategy for cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in China. *Control of Insect Pests*, v.7, p.559-565. 2007

Wyckhuys, K. A., Lu, Y., Morales, H., Vazquez, L. L., Legaspi, J. C., Eliopoulos, P. A., & Hernandez, L. M. (2013). Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. *Biological Control*, 65(1), 152-167.

Zalucki, M. P. et al. The biology and ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? *Australian Journal of Zoology*, Melbourne, v. 34, n. 6, p. 779-814, 1986

Zhang, Y.J.; Feng, M.G.; Fan, Y.H.; Luo, Z.B.; Yang, X.Y.; Wu, D.; Pei, Y. A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology*, v.18, n. 6, p.543-555, 2008.