

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

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS PARA
O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera* (Hübner)
(Lepidoptera: Noctuidae): EFEITOS LETAIS,
SUBLETAIS E AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA**

Tamires Doroteo de Souza

Engenheira Florestal

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

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS PARA
O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera* (Hübner)
(Lepidoptera: Noctuidae): EFEITOS LETAIS,
SUBLETAIS E AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA**

Discente: Eng. Florestal. Tamires Doroteo de Souza

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

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

S729s

Souza, Tamires Doroteo

Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): efeitos letais, subletais e avaliação da persistência / Tamires Doroteo Souza. -- Jaboticabal, 2020

85 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk

1. Microrganismos. 2. Inseto. 3. Pragas agrícolas. 4. *Glycine max*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

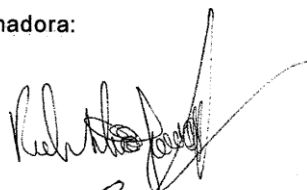
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE
Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): EFEITOS LETAIS,
SUBLETAIS E AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA

AUTORA: TAMIRES DOROTEO DE SOUZA

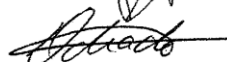
ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DANIEL RICARDO SOSA-GÓMEZ
EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja / Londrina/PR



Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TAMIRES DOROTEO DE SOUZA- Natural de Ubaíra, BA, nascida em 06 de abril de 1993, filha de Cosme Doroteo de Souza e Rosenilda de Jesus Sousa. Formada em Engenharia Florestal pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB, Câmpus Cruz das Almas, no ano de 2017, durante a graduação desenvolveu trabalhos com produção de iscas biológicas para o controle de formigas cortadeiras e levantamento de espécies de parasitoides (forídeos) de formigas do gênero *Atta*, sob orientação da Prof. Dr. Rozimar de Campos Pereira. Em março de 2018 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, desenvolvendo suas pesquisas na área de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk.

“Escale todas as montanhas, cruze todos os rios,
siga todos os arco-íris, até encontrar seus sonhos”

Rodgers e Hammerstein

Dedico...

A minha mãe Rosenilda de Jesus Sousa, meu pai Cosme Doroteo de Souza e aos meus irmãos Tarcio Doroteo de Souza e Tales Doroteo de Souza pelo amor incondicional, e por todo o incentivo para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente pelo dom da vida.

Aos meus pais Rosenilda e Cosme que sempre estiveram presente me apoiando e sonhando junto comigo.

Aos meus irmãos Tarcio e Tales por sempre acreditarem em mim.

A minha tia Kêda pela força, determinação e exemplo de superação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pela orientação e ensinamentos nas atividades desenvolvidas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP/FCAV, pela oportunidade de realização do curso.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Entomologia Agrícola pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do curso.

Aos Professores Dr. Guilherme Duarte Rossi e Dr. Arlindo Leal Boiça Junior pela participação e colaboração no meu Exame Geral de Qualificação.

Aos meus amigos Ariadne Costa Sanches, Fabricio de Oliveira Fernandes e Kamila Maria Elias Fonseca, pela amizade e por todos os momentos que passamos juntos, vocês foram minha família em Jaboticabal-SP, essencial para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos que sempre me ajudaram quando precisei Cíntia Melo, Andressa Vilela e Tamires Souza.

Ao meu namorado Antonio Alves Pinto pelo carinho e toda compreensão que teve comigo.

A toda minha família que sempre esteve presente me apoiando.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.2 <i>Helicoverpa armigera</i> importância econômica.....	3
2.2 Biologia e morfologia	4
2.3 Fase de ovo	4
2.4 Fase larval	4
2.5 Fase de pupa.....	5
2.6 Fase adulta.....	5
3- <i>Helicoverpa armigera</i> na cultura da soja	5
4- Métodos de controle para <i>Helicoverpa armigera</i>	6
4.1 Controle comportamental.....	6
4.2 Controle químico.....	7
4.3 Controle microbiano.....	7
4.3.1 Fungos entomopatogênicos.....	8
4.3.2 <i>Beauveria bassiana</i>	9
4.3.3 <i>Metarhizium anisopliae</i>	10
5. Seleção de isolados fúngicos	11
6. Efeito subletal	12
7. Defesa do hospedeiro frente ação dos fungos.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 2- EFEITO LETAL E SUBLETAL DE ISOLADOS FÚNGICOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. E <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vüillemin EM <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). 25	
RESUMO.....	25
ABSTRACT	26
1- INTRODUÇÃO.....	27
2- MATERIAIS e MÉTODOS	28
2.1 Criação de <i>H. armigera</i>	28
2.2 Preparo dos isolados fúngicos para realização dos bioensaios.....	29
2.3 Teste de viabilidade dos conídios	29
2.4 Ensaio de mortalidade	30
2.5 Estimativa da concentração letal média (CL ₅₀) de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> sobre lagartas de <i>H. armigera</i>	31
2.6 Avaliação dos efeitos subletais	31
2.7 Análise estatística.....	33
3- RESULTADOS	33

3.1 Teste de mortalidade	33
3.2 Viabilidade de conídios	34
3.3 Estimativa de CL ₅₀	35
3.4 Longevidade e fecundidade de <i>H. armigera</i>	35
3.5 Sobrevivência	39
3.6 Razão sexual e peso das lagartas e pupas.....	43
3.6.1 Impacto do fungo <i>B. bassiana</i> nos parâmetros biológicos de <i>H. armigera</i> ..	43
3.6.2 Impacto do fungo <i>M. anisopliae</i> nos parâmetros biológicos de <i>H. armigera</i>	43
3.7 Tabela de vida	44
4- DISCUSSÃO	47
5- Conclusões.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CAPÍTULO 3- SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Helicoverpa armigera</i> (Hubner) A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM CONDIÇÃO DE CAMPO NA CULTURA DA SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill): UM ESTUDO DE PERSISTÊNCIA.....	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT	56
1- INTRODUÇÃO.....	57
2- MATERIAIS e MÉTODOS	59
2.1 Obtenção e criação de <i>Helicoverpa armigera</i>	59
2.2 Seleção de isolados.....	59
2.3 Aplicação em campo	60
2.4 Coleta e manuseio dos discos de folhas	61
2.5 Avaliação da persistência	61
2.6 Efeito subletal em <i>Helicoverpa armigera</i>	62
2.7 Análise dos dados	63
3- RESULTADOS	64
3.1 Sobrevivência dos fungos em relação a temperatura	64
3.2 Efeito do tempo após a aplicação de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> na mortalidade de <i>H. armigera</i>	64
3.3 Efeito subletal	67
3.4 Influência das UFCs nos efeitos subletais	69
3.5 Tabela de vida	70
4- DISCUSSÃO	75
5- Conclusões.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS	82

SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): EFEITOS LETAIS, SUBLETAIS E AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA

RESUMO- A lagarta do algodão, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das mais importantes pragas da agricultura mundial. Os danos causados por essa espécie ocorrem desde a emergência da planta. O uso desordenado de produtos químicos para controlar essas lagartas acelerou o desenvolvimento de resistência e têm causado efeitos adversos aos inimigos naturais, tornando-se uma grande preocupação ambiental. Diante disso, a busca por medidas alternativas que visam diminuir esses impactos aumenta. Agente de controle microbiano é considerada uma alternativa eficiente e segura, especialmente o uso de fungos entomopatogênicos. As principais espécies de fungos entomopatogênicos utilizadas são *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, essas têm sido utilizadas para controlar insetos pragas de várias ordens, e a variabilidade genética presente nesses microrganismos é muito alta, possibilitando estudos de seleção de isolados fúngicos para o desenvolvimento de formulações eficientes em condições de laboratório e campo. Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para controle de *H. armigera* em condições de laboratório e campo (persistência) considerando os efeitos letais e subletais. Nos primeiros bioensaios utilizou-se 23 isolados, sendo 10 isolados de *M. anisopliae* e 13 de *B. bassiana* avaliando a interação das lagartas e os isolados fúngicos. Para isso foram confeccionadas tabelas de vida e realizados testes de mortalidade, efeitos subletais e virulência com 200 lagartas do 2º ínstar de *H. armigera*. Os isolados que apresentaram mortalidade superior a 80% até o sétimo dia de avaliação foram selecionados para etapa posterior do estudo. A virulência foi mensurada pela estimativa da CL_{50} , com emprego da análise de Probit. Nos efeitos subletais utilizou-se o procedimento de bootstrap para estimar as médias e erro padrão dos parâmetros biológicos, tempo de desenvolvimento, fecundidade e longevidade das lagartas sobreviventes. A avaliação de persistência pulverizou-se suspensões fúngicas na cultura da soja no estágio fenológico v3, nas safras 2018/2019 e 2019/2020 com um isolado de cada fungo sendo os mais promissores do resultado de mortalidade. No momento da pulverização as caldas apresentavam uma concentração 10^8 conídios.mL⁻¹. Após a pulverização dos tratamentos, foram coletados folíolos contando-os em discos foliares em oito tempos (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 horas após a aplicação) totalizando 55 discos de folhas por tratamento/avaliação. A avaliação da presença do fungo nas folhas, 150 µL da suspensão fúngica composta por água e discos foliares foram vertidas em placa do tipo Rodac, com meio de cultura. Após 72 horas de inoculação foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônia como indicativo da persistência do fungo. Os ensaios de suscetibilidade de *H. armigera*, foram utilizadas 50 lagartas para cada tempo de coleta e oferecido um disco de folha com os tratamentos fúngicos. A avaliação da mortalidade foi feita no final de sete dias. *B. bassiana* apresentou maior número de isolados promissores do que o fungo *M. anisopliae*. Os ensaios de suscetibilidade demonstraram que os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* afetam a biologia do inseto, em termos de custos adaptativo, sobrevivência e

reprodução, com redução dos parâmetros da tabela de vida. A avaliação de persistência foi demonstrado que *B. bassiana* foi infectivo durante as oito horas de avaliação, sendo mais persistente do que o *M. anisopliae* que no primeiro ano persistiu por três horas e no segundo ano com temperaturas mais amenas durou cinco horas. A mortalidade de *H. armigera* diminuiu com o aumento das horas após a aplicação, sendo que nas três primeiras horas ocorreu maior porcentagem para os dois fungos.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, lagarta do algodão, controle microbiano.

SELECTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR THE CONTROL OF *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): EVALUATION OF PERSISTENCE, LETHAL AND SUBLETHAL EFFECTS

ABSTRACT- The cotton caterpillar, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the most important pests in world agriculture for attacking several species of plants of economic importance. The damage caused by this species occurs since the emergence of the plant. The disordered use of chemicals to control these caterpillars has accelerated the development of resistance and has caused adverse effects to natural enemies, becoming a major environmental concern. Therefore, the search for alternative measures to reduce these impacts increases. Microbial control agent is considered an efficient and safe alternative, especially the use of entomopathogenic fungi. The main species of entomopathogenic fungi used are *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, these have been used to control insect pests of various orders, and the genetic variability present in these microorganisms is very high, enabling studies on the selection of fungal isolates for the development of efficient formulations under laboratory and field conditions. Thus, the objective of this work was to select isolates of the entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* to control *H. armigera* in laboratory and field conditions (persistence) considering the lethal and sublethal effects. In the first bioassays, 23 isolates were used, 10 of which were *M. anisopliae* and 13 of *B. bassiana*, evaluating the interaction of caterpillars and fungal isolates. For that, life tables were made and tests of mortality, sublethal effects and virulence were performed with 200 caterpillars of the 2nd instar of *H. armigera*. The isolates that presented mortality greater than 80% until the seventh day of evaluation were selected for a later stage of the study. Virulence was measured by the LC₅₀ estimate, using Probit analysis. In the sublethal effects, the bootstrap procedure was used to estimate the means and standard error of the biological parameters, development time, fertility and longevity of the surviving caterpillars. The persistence assessment was sprayed with fungal suspensions in the soybean crop in the phenological stage v3, in the 2018/2019 and 2019/2020 harvests, with one isolate from each fungus being the most promising of the mortality result. At the time of spraying, the mixtures had a concentration of 10⁸ conidia.mL⁻¹. After spraying treatments, leaf discs were collected in eight stages (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 hours after application), totaling 55 leaf discs per treatment / evaluation. The evaluation of the presence of the fungus in the leaves, 150 µL of the fungal suspension composed of water and leaf discs were poured into a Rodac plate, with culture medium. After 72 hours of inoculation, the counting of Colony Forming Units (CFU) was performed as an indicator of the persistence of the fungus. The *H. armigera* susceptibility tests used 50 caterpillars for each collection time and offered a leaf disc with the fungal treatments. Mortality was assessed at the end of seven days. *B. bassiana* showed a higher number of promising isolates than the fungus *M. anisopliae*. The susceptibility tests showed that the isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana* affect the biology of the insect, in terms of adaptive costs, survival and reproduction, with a reduction in the parameters of the life table. The persistence evaluation showed that *B. bassiana* was infectious during the eight hours of evaluation, being more persistent than *M. anisopliae* which in the first year persisted for three hours and in the second year with milder temperatures lasted five hours. The mortality of *H. armigera* decreased with the

increase in hours after application, with a higher percentage for both fungi occurring in the first three hours.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, cotton caterpillar, microbial control.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1- INTRODUÇÃO GERAL

A lagarta do algodão, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é citada como uma das mais importantes pragas da agricultura mundial por atacar várias espécies de plantas de importância econômica (Ignacimuthu e Sekulic et al., 2004; Chougule et. al., 2005). No Brasil, o atraso da identificação da espécie dificultou o controle em várias regiões do País (Sosa-Gómez et al., 2016), acarretando uma disseminação rápida e danos severos nas culturas. As primeiras amostras de *H. armigera* foram encontradas em Rolândia/Paraná entre 2008 e 2011, mas somente em 2013 foi corretamente identificada (Czepak et al., 2013).

Também conhecida pela facilidade de adaptação nas mais diversas regiões e climas, as lagartas de *H. armigera* alimentam-se de folhas e estruturas reprodutivas das plantas, acarretando perdas de até 80% na produção em mais de 100 espécies de plantas cultivadas, incluindo Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (Fitt, 1989; Ali e Pogue, 2004; Choudhury, 2009). No Brasil, esta espécie já foi encontrada alimentando-se de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Malvaceae), soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Solanaceae), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Fabaceae), sorgo (*S. bicolor* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae), e plantas daninhas (Ávila et al., 2013).

O uso desordenado de produtos químicos para controlar *H. armigera* acelerou o desenvolvimento de resistência a alguns inseticidas como flubendiamida e clorantraniliprole (Mckenzie, 2000; Oliveira, 2008; Kuss et al., 2016). Além da resistência esses produtos vem causando efeitos adversos aos inimigos naturais tornando-se uma grande preocupação ambiental (Ahmad et al., 2003; Patil et. al., 2006; Wu, 2007). Diante dessa situação, a busca por medidas alternativas que visam diminuir esses impactos aumenta. Agente de controle biológico incluindo agentes de controle microbiano de inseto são considerados uma alternativa eficiente e segura, especialmente o uso de fungos entomopatogênicos.

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) e o uso de fungos para o manejo de

pragas é uma realidade (Coates et al., 2002; Thungrabeab, 2007). As principais espécies de fungos entomopatogênicos utilizadas são *Beauveria bassiana* (Chandler e Davidson, 2005;) e *Metarhizium anisopliae* (Sahayaraj et al., 2010; Dong et al., 2007). Essas espécies têm sido utilizadas para controlar hemípteros, lepidópteros, coleópteros, dípteros e ácaros em diferentes culturas. O fungo *M. anisopliae* por exemplo já foi relatado como agente eficaz para o controle de *H. armigera* (Lacey, 2017).

A variabilidade genética desses microrganismos é muito alta, o que pode ser considerada uma das principais vantagens no uso no programa de manejo (Vieira et al., 2014). Características-chaves como virulência e persistência no ambiente podem ser diferentes para isolados de uma mesma espécie (Goettel et al., 2010).

Dessa maneira, estudos de seleção de isolados fúngicos são essenciais para o desenvolvimento de formulações eficientes em condições de laboratório e campo, associando os diversos conhecimentos a respeito do ambiente e dinâmica populacional da praga (Storch, 2014, Jarrahi, Safavi, 2016; Kalvnadi et al, 2018). Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para controle de *H. armigera* em condições de laboratório e campo (persistência) considerando os efeitos letais e subletais.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.2 *Helicoverpa armigera* importância econômica

A espécie *H. armigera* (Noctuidae: Heliothinae) é uma das principais pragas em todo mundo, devido à alta capacidade de dispersão, alta taxa de reprodução, polifagia e diapausa em latitudes mais altas (Fitt, 1989; Sosa-Gómez et al., 2016). No Brasil a praga foi relatada em março de 2013, na ocasião os espécimes foram coletados nos estados da Bahia, Mato Grosso, Paraná, Goiás e no Distrito Federal, causando danos em milho, soja e algodão (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013). No entanto, estudos posteriores comprovaram que essa praga foi introduzida no País possivelmente em outubro de 2008, e em agosto de 2012 a espécie já estava distribuída desde o extremo sul até o norte do País (Sosa-Gómez et al., 2016).

Helicoverpa armigera apresenta uma alta capacidade de se desenvolver em uma gama de hospedeiros, sendo registrada em mais de 100 espécies, incluindo plantas das famílias Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (Ali e Choudhury, 2009; Fitt, 1989; Pawar et al., 1986; Pogue, 2004). As lagartas se alimentam tanto de órgãos reprodutivos, causando uma perda anual que supera 2 bilhões de dólares apenas na região dos trópicos semiáridos da Europa (Sharma et al., 2012). O ataque de uma única lagarta pode consumir de 30 a 40 vagens de grão de bico por planta (Ali et al., 2009).

A inerente capacidade de *H. armigera* causar danos em culturas de interesse econômico levou a perdas de até 80% da produção na cultura do algodão na safra de 2011/2012 na região do oeste da Bahia. Em outras culturas como soja e feijão, as perdas chegaram a R\$ 140,00 ha⁻¹ na safra seguinte (Czepak et al., 2013). Para safra de 2013/2014, estimou-se que as perdas causadas por essa praga chegaram a \$ 2 bilhões, decorrente da redução da produtividade das culturas e dos custos com aplicação de inseticidas (Leite et al., 2014). Já na safra de 2017/2018 a redução foi de 4,1% em relação as safras anteriores (Conab, 2018). Na Europa, *H. armigera* causa redução na produção entre 28-40%, resultando em perdas econômicas de \$ 300 milhões/ano (Nazrussalam et al., 2007; Sharma et al., 2012). Na Espanha, *H. armigera* é considerada uma praga devastadora nos cultivos de tomate (Arnó et al., 1999).

A nível mundial, as perdas causadas por *H. armigera* são estimadas em \$ 5 bilhões por ano (Lammers e Macleod, 2007).

2.2 Biologia e morfologia

As lagartas de *Helicoverpa armigera* tem hábito noturno por possuir atividade crepuscular, ficando a maior parte do dia em repouso (Araújo, 1990). É um inseto holometábolo, com ciclo de vida de 30 e 60 dias, podendo ter o desenvolvimento influenciado pela qualidade nutricional do alimento e por fatores ambientais, como temperatura e umidade (Guedes et al., 2013).

2.3 Fase de ovo

Os ovos têm coloração creme-branco com aspecto brilhante quando recém colocados, ficando mais escuros depois de três dias chegando a ficar acastanhado antes da eclosão. Possui uma área convexa com o centro deprimido, a porção apical é lisa com o restante da superfície esculpida por nervuras longitudinais, apresentam diâmetro de 0,36 mm e comprimento de 0,45 mm (Santos, 2018).

Cada fêmea pode ovipositar até 3 mil ovos, sendo as primeiras posturas inférteis. As posturas são dispostas de forma individual geralmente na face adaxial da folha ou sobre os talos, flores e brotações. O período de incubação dos ovos é, em média de 3,3 dias a 25° C (Mensah, 1996; Silva, 2017).

2.4 Fase larval

Helicoverpa armigera possui seis instares larvais com duração de 14 a 18 dias (Gómez, 2016). No primeiro instar as lagartas apresentam linhas longitudinais de cor amareladas com a capsula cefálica e pernas de coloração mais escuras, apresentam o corpo com cerdas escuras abundantes com a base brilhante, podendo ser facilmente confundida com outras espécies da subfamília Heliothinae. No segundo instar as lagartas apresentam coloração marfim com um ponto dorsal preto no centro do terceiro segmento (Santos, 2018). A partir do terceiro instar larval a cor é totalmente variável (Silva, 2017), a duração de cada instar diminui com o aumento da temperatura, em condições extremas como relatado por Fitt (1989), o período pode se estender até 41 dias a 15°C.

2.5 Fase de pupa

No final do ciclo larval, as lagartas param de se alimentar e se deslocam para o solo, onde encontram condições favoráveis para a pupação. As pupas apresentam coloração castanho claro logo após a formação ficando escurecidas em cinco dias. Nessa fase, é possível distinguir o sexo através da observação externa das genitálias (Santos, 2018). A pupa é do tipo obtecta, apresentando um formato fusiforme com superfície arredondada nas partes terminais. A duração da fase pode variar de 10 a 14 dias e o tamanho da pupa estar entre 12 a 20 mm (Santos, 2018).

2.6 Fase adulta

Os adultos de *H. armigera* apresentam o corpo coberto de escamas, olhos compostos semiovais proeminentes, antenas do tipo filiforme com 83 flagelômeros. Podem apresentar dimorfismo sexual pelo 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 abdome, sendo o da fêmea mais arredondada (Jayaraj, 1972). Tanto a fêmea quanto o macho apresentam machas reniforme clara nas asas anteriores e linhas de sete a oito pontos escuros na margem externa.

Normalmente a longevidade das fêmeas é maior que a dos machos, sendo de 11,7 e 9,2 dias, respectivamente. O período de oviposição é de cerca de 5,3 dias, com alto potencial reprodutivo. Os adultos dessas espécies são atraídos por flores que produzem néctar (Naseri et al., 2011).

3- *Helicoverpa armigera* na cultura da soja

No Brasil, a lagarta encontra-se amplamente disseminada sendo considerada praga-chave em várias culturas (Czepak et al., 2013). O primeiro surto desta praga na cultura da soja, em 2012/2013, causou um prejuízo de mais de \$ 2 bilhões (Sharma et al., 2012). Na fase larval *H. armigera* têm preferência por estruturas reprodutivas como botões florais, legumes e grãos; apesar de se alimentar de folhas e hastes das plantas (Rogers e Brier, 2010; Bortolotto et al., 2014).

Os danos causados na soja ocorrem desde a emergência da planta, quando as lagartas seccionam as plantas sob os cotilédones. A partir do estágio V3 da cultura, a lagarta se comporta como desfolhadora e ataca o broto terminal, estudos com o desenvolvimento das lagartas de *H. armigera* em soja concluiu que quando as lagartas atingem o quarto instar elas tem preferência por folhas mais velhas e grãos bem desenvolvido (Suzana et al., 2018).

O nível de controle para *H. armigera* em soja encontra-se em estudo e ainda não foi estabelecido no Brasil. Com base na experiência de outros países, como Argentina e para outras espécies de *Helicoverpa* que atacam frutos e grãos, é possível estimar que os valores dos níveis de controle são muito baixos. Por medida de precaução, até o desenvolvimento dos estudos de níveis de controle para a soja brasileira, recomenda-se a adoção de quatro lagartas por m² ou 30% de desfolha no período vegetativo (Embrapa, 2016).

4- Métodos de controle para *Helicoverpa armigera*

4.1 Controle comportamental

Esse método fundamenta-se em técnicas que alteram o comportamento dos insetos com a finalidade de diminuir suas populações, utilizando a forma de comunicação dos insetos no controle (Santos, 2017). Os insetos da mesma espécie comunicam-se através de estímulos químicos, chamados de feromônios que são utilizados no monitoramento das pragas com uso de armadilhas. O monitoramento populacional de uma praga é uma ferramenta importante, principalmente do ponto de vista da determinação da época de ocorrência e pico populacionais, auxiliando na tomada de decisão para o controle (Costa et al., 2008).

O uso das armadilhas de feromônios é o meio mais fácil e menos oneroso para monitorar a maiorias das pragas, esses feromônios podem ser de atração, repelentes e sexuais, o uso depende da estratégia de manejo adotado. Para *H. armigera*, o feromônio sexual já foi indicado como uma estratégia de controle, através da técnica de confundimento de machos. A aplicação do feromônio sexual em vários locais na área de plantio a qual deseja proteger, e em doses elevadas, faz com que o macho fique desorientado enquanto faz a busca para encontrar a fêmea para o acasalamento (Czepak et al., 2013).

Outras técnica, chamada de “Push-Pull”, já foi utilizada para o controle de *H. armigera*, principalmente em cultivos de algodão na Austrália. Esta se baseia na manipulação do comportamento da praga por meio de estímulos visuais e de compostos voláteis emitidos pela planta hospedeira com a finalidade de reduzir a oviposição ou a alimentação do inseto. Esse sistema é constituído de uma cultura principal, a que se deseja proteger do ataque da praga, e outra de uma cultura armadilha, onde o inseto será atraída com o objetivo de controlá-los (Fathipour e Sedaratian, 2013).

4.2 Controle químico

A aplicação de inseticidas químicos é o principal método utilizado para o controle de *H. armigera* em várias culturas. Comparado com as demais pragas, *H. armigera* se destaca pela capacidade de rápida evolução da resistência aos produtos químicos utilizados (Alvi et al., 2012). A dosagem desses produtos, para uma ação efetiva é muito elevada onerando o custo e acelerando a evolução da resistência (Torres-vila et al., 2002; Bués et al., 2005; Alvi et al., 2012; Frozza, 2013).

Os produtos registrados para o controle de *H. armigera* têm como ingredientes ativos oxadiazina, metomil, metaxifenoza, clorfluazurom, clorpirifós e zetacipermetrina (Agrofit, 2019), sendo esses produtos tóxicos ao meio ambiente e ao inimigos naturais. Nesse sentido, a busca por alternativas de controle para complementar e diminuir dosagens desses produtos químicos é de extrema importância para manutenção do agroecossistema. Dentre as alternativas, a utilização de microrganismo no controle biológico.

4.3 Controle microbiano

O controle microbiano teve início no século XIX, com a utilização do fungo *Beauveria bassiana* (Berliner, 1915) em *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), impulsionando a utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas (Alves, 1998). Os principais agentes entomopatogênicos são bactérias, vírus, nematoides e fungos. A ação desses entomopatogênicos têm se mostrando uma tática promissora, devido a uma série de fatores, tais como a especificidade, seletividade, elevada capacidade de multiplicação, dispersão no ambiente, ausência ou redução da poluição no ambiente e toxicidade ao homem e a outros organismos não-alvo, além da alta variabilidade genética desses

microrganismos podendo ser considerada uma das principais vantagens para o controle de insetos pragas (Tanada e Kaya, 1993).

4.3.1 Fungos entomopatogênicos

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados no controle biológico. Aproximadamente 80% das doenças têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies, sendo a maioria dos gêneros dos fungos entomopatogênicos relatados no Brasil (Alves, 1998).

A ocorrência natural desses fungos também tem sido um fator importante para redução das populações de pragas. Os primeiros relatos que demonstraram a eficiência de fungos no controle de insetos-praga ocorreram no ano de 1835, por Agostino Bassi, quando ele associou a doença do bicho da seda, *Bombyx mori*, com um patógeno fúngico, mais tarde nomeado como *Beauveria bassiana* ou “muscardine branca” (Lacey et al., 2015). Já o gênero *Metarhizium* foi primeiramente descrito por Metschnikoff em 1879, como *Entomophthora anisopliae* e posteriormente transferido para o novo gênero *Metarhizium* por Sorokin em 1883, o qual ficou conhecido como “muscardine verde” (Zimmermann, 2007). Krassiltschik em 1884, continuou estudos com este fungo, chegando a produzir cerca de 55 kg de conídios secos, conseguindo controlar de 55 a 80% dos insetos em pequenas áreas, após dez a quinze dias da aplicação (Alves, 1998).

A ocorrência de *M. anisopliae* no Brasil, teve o primeiro relato em 1923, quando Pestana descreveu a ocorrência em uma espécie de cigarrinha. Os estudos envolvendo fungos entomopatogênicos só ganharam destaque a partir do ano de 1964, quando finalmente foi registrado a primeira epizootia de *M. anisopliae* sobre cigarrinhas das folhas da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (Stal, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) (Alves et al., 2008).

Atualmente, o uso inundativo desse fungo como estratégia de controle no programa de controle biológico tem sido muito eficiente contra as principais pragas da cana-de-açúcar, em mais de 9.110,9 mil hectares de cana com esse microrganismo (Conab, 2018). A maioria dos estudos dos fungos entomopatogênicos estão voltados para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, devido a eficiência comprovada contra insetos pragas, fácil produção artificial e

ocorrência natural.

Estudos conduzidos com fungos entomopatogênicos para o controle de *H. armigera* tem mostrado que essa alternativa apresenta potencial de controle da praga. Rijal (2008), comparou a eficiência dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com inseticidas químicos e observou que os tratamentos com os fungos apresentaram uma redução de 56,66% dos danos no grão-de-bico em condições de campo. Naher et al. (2008) e Deshpande et al. (2000) relataram que esses microrganismos podem efetivamente controlar *H. armigera* com diferentes taxas de eficiência, dependendo das condições ambientais.

4.3.2 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana é uma espécie generalista, sendo mais frequente sobre os insetos em amostras de solo. Está inserido na ordem Hypocreales e na família Clavicipitaceae e foi o primeiro fungo a ser cultivado em laboratório, podendo colonizar insetos de várias ordens (Fernandes et al., 2006). A infecção ocorre normalmente via tegumento, onde o fungo germina entre 12 e 18 horas, dependendo da disponibilidade de nutrientes, como, glucose, quitina, nitrogênio e protease (Alves, 1998). Existe casos onde infecção oral pode ocorrer em alguns insetos, como é o caso de *Solenopsis* spp., sendo também possível a penetração via respiratória pelo espiráculos (Robinson, 1966).

O modo de ação de *B. bassiana* quando em contato com o tegumento do inseto, passa por sete estágios sendo eles: adesão, germinação, formação de apressório, formação do grampo de penetração, penetração, colonização e reprodução. Para que ocorra todas essas etapas é necessário a presença de umidade e temperatura adequada para emissão da estrutura de penetração. O apressório realizará a função ao entrar em contato com os espiráculos, ou ainda irão degradar o exoesqueleto, colonizando o inseto. Em condições atípicas pode ocorrer a ingestão de conídios e a colonização ocorrer de dentro para fora (Shah e Pell, 2003).

A dispersão desse fungo por insetos tem sido explorada no manejo de pragas em estratégias de auto propagação (Meadow et al., 2000; Dowd, 2003; Vickers et al., 2004). Formulações comerciais vem sendo desenvolvidas para o controle biológico de importantes pragas agrícolas (Fan et al., 2011). No Brasil, já estão disponíveis 26 produtos tendo como ingrediente ativo *B. bassiana*

(Agrofit, 2019). A eficiência deste fungo entomopatogênicos já foi comprovada em diversos trabalhos para o controle de artrópodes pragas e ácaros (Meyling e Einlenberg, 2007).

4.3.3 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium é dos gêneros de fungos entomopatogênicos mais abundante em amostras de solo (Roberts e Leger, 2004). Está inserido na ordem Hypocreales e foi identificado pela primeira vez por Metschnikoff, em 1879 (Zimmermann, 1993). Dentro do gênero *Metarhizium* a espécie mais utilizada no controle microbiano é *M. anisopliae* pertencente à família Clavicipitaceae.

Metarhizium anisopliae apresenta um metabolismo extremamente versátil, permitindo o crescimento em várias condições ambientais (Roberts e Leger, 2004). O crescimento ocorre de forma vegetativa como micélio, produzindo hifas e conídios, que são os propágulos em artrópodes hospedeiros e em meios de cultura. Embora a gama de hospedeiros de *M. anisopliae* seja ampla, algumas estirpes podem ser hospedeiras específicas (Schranka e Vainstein, 2010).

Como a maioria dos fungos pertencente a ordem Hypocreales, *M. anisopliae* também infecta 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; germinação e desenvolvimento dos conídios; diferenciação de tubo germinativo em apressório; penetração da cutícula; diferenciação de hifas em blastósporos e presença de hifas na hemolinfa; colonização do hospedeiro; extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro, formação de conidióforos e produção dos conídios (Charnley, 2003; Schranka e Vainstein, 2010).

Muitos produtos comerciais baseados neste fungo estão disponíveis no mercado (Faria e Wraight, 2007; Mishra et al., 2015). No Brasil estão disponíveis 37 produtos com diferentes formulações, no entanto, nenhum desses produtos possui recomendação para lepidópteros pragas (Agrofit, 2019). O fungo *M. anisopliae* foi investigado para o controle biológico de *H. armigera* com eficácia bem documentada, mostrando um excelente potencial de controle (Jarrahi, 2016; Nguyen et al., 2007; Kulkarni et al., 2008).

5. Seleção de isolados fúngicos

A variabilidade genética existente entre esses microrganismos é em parte devida a grande biodiversidade em diversos ecossistemas, o que torna possível a obtenção de isolados promissores para uso no controle biológico (Thomas, 2007). Características-chave como virulência e persistência no ambiente podem ser expressos de diferentes formas para microrganismos de uma mesma espécie (Goettel et al., 2010).

Um método de caracterização de espécies para efeito de seleção de isolados para o controle microbiano de insetos pode ser realizado obtendo-se um perfil biológico dos isolados (Alves, 1998). A primeira ação para selecionar um isolado com potencial para o controle de uma determinada praga é a capacidade de produção de propágulos infecciosos de maneira econômica, ou seja, a capacidade do isolado de produzir maior qualidade de conídios viáveis com baixo custo de produção. A segunda etapa é avaliar a capacidade do isolado em expressar a infectividade, que é a capacidade de penetração no hospedeiro, a patogenicidade. A terceira e última etapa para escolha do isolado é a avaliação da virulência, que corresponde a agressividade do isolado em causar a doença no inseto (Alves e Lecuna, 1998; Shapiro-Ilan et al., 2005; Vega et al., 2009).

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, compreendem um importante grupo de patógenos de artrópodes pragas, e a obtenção desses resultados promissores é dependente do processo de seleção de isolados que é realizado (Fravel, 2005). Escolher o isolado mais promissor para cada praga se torna interessante considerando que não apenas os parâmetros de produção e patogenicidade serão testados, mas a ação da virulência e os efeitos sobre os insetos alvos. Selecionar um isolado que seja capaz de apresentar efetividade no controle causando além da mortalidade alteração da biologia do inseto alvo, resultará na inviabilização do aumento da população da praga, tornando-se um excelente componente, responsável por manter a população de insetos abaixo do nível de dano econômico (Jaronski, 2010).

Estudos de seleção de isolados para implementação do controle microbiano vêm sendo desenvolvidos desde a década de 90, entretanto a variabilidade existente nesse organismo permite que novos estudos sejam cada vez mais promissores, como por exemplo: estudar os efeitos deletérios (subletal)

que esses entomopatogênos podem causar em uma determinada população (Pagliosa et al., 1994; Soares et al., 1995; Borges, 2007; Leite et al., 2011).

6. Efeito subletal

Estudos sobre efeitos subletais em populações de insetos-praga ainda são muito restritos, principalmente com produtos biológicos como os fungos entomopatogênicos. No entanto, os estudos disponíveis na literatura mostraram resultados relevantes, como alteração na sobrevivência dos adultos, diminuição no número de ovos e pupas e adultos defeituosos (Hari e Mahal, 2008; Ahmad e Ansari, 2013; Jarrahi, 2016; Kalvnadi et al., 2018). Estes efeitos subletais podem ser expressos como mudanças no comportamento do inseto, permitindo um controle promissor em gerações subsequentes dos insetos que foram expostos a esses patógenos (Desneux et al., 2007).

Efeitos deletérios em *H. armigera* utilizando produtos químicos como cipermetrina já foram mencionados na literatura causando alteração em todo ciclo biológico, como mudanças no desenvolvimento, crescimento, reprodução, metabolismo e fisiologia, sob concentrações subletais (Ahmad e Ansari, 2013; Hari e Mahal, 2014). Os entomopatogênos além de mostrarem efeito significativo na mortalidade vêm sendo documentados os efeitos subletais que eles têm causado em diferentes espécies de insetos-praga. Em um estudo realizado para avaliar os efeitos subletais de *B. thuringiensis* em *H. armigera*, mostrou alto custo de condicionamento físico incluindo aumento do período larval, redução do peso da pupa e redução do potencial reprodutivo (Safavi, 2007; Sedaratian et al., 2013).

Em outro estudo, o efeito de concentrações subletais do nucleopoliedrovírus (NPV) foi investigado em *H. armigera* como taxas metabólicas, aumentando significativamente o desenvolvimento dos sobreviventes (Bouwer et al., 2009). Além disso, a exposição de *H. armigera* a um efeito combinado de *B. thuringiensis* expressando Cry1Ac e um vírus da poliedrose citoplasmática (HaCPV) indicaram uma interação aditiva entre esses dois agentes de biocontrole, causando efeitos deletérios na geração seguinte (Marzban et al., 2009).

Entomopatogênos fúngicos também já foram relatados causando efeito subletal em populações de *H. armigera*. Jarrahi (2016) estudou os efeitos

subletais de *M. anisopliae* em *H. armigera* e observou que os parâmetros biológicos de duração das fases larvais e fecundidade foram reduzidos, bem como a duração do ciclo de vida também foi afetado na geração F1, derivada de lagartas expostas às concentrações subletais. O fungo *B. bassiana* quando testado em *H. armigera*, alterou a duração dos estágios imaturos, aumentando significativamente em relação ao controle, o período de pré-oviposição foi significativamente maior e a fecundidade foi diminuída 7,61% em comparação ao controle (Kalvnadi et al. 2018).

7. Defesa do hospedeiro frente ação dos fungos

Para combater a infecção, muitas vezes os insetos desenvolvem vários mecanismo de defesa que diferente de outros vertebrados, onde não possuem o sistema imunológico adaptativo, ou seja, os insetos não produzem anticorpos para impedir a ação dos patógenos (Lemaitre e Hoffmann, 2007). No lugar da produção de anticorpos, os insetos exibem balanços hormonais como mecanismo de defesa, por exemplo aumento na produção de peptídeos anti-microbianos (AMPs) sinalizando as vias responsáveis pela detecção de diferentes classes de microrganismos (Valanne et al., 2011).

Os AMPs são sintetizados na epiderme chegando na hemolinfa para combater os patógenos, esses peptídeos formam poros na membrana microbiana e emite sinais para ampliação da protease, essas moléculas têm inúmeras funções e trabalham em conjunto para induzir a produção de genes imunes (Lu e Leger, 2016). A formação dessas respostas imune depende também dos hemócitos que são divididos em tipos diferentes de acordo com as características morfológicas e fisiológicas do inseto.

Existem pelo menos três diferenciais tipos de hemócitos: plasmatócitos, células de cristal e lamelócitos (Evans e Banerjee, 2003; Hartenstein, 2006). Os hemócitos dos insetos estão envolvidos em uma série de defesas celulares, incluindo nodulação, fagocitose e encapsulamento dos invasores (Michael, 2008).

Além das respostas imunológicas hormonais e celulares, durante a invasão fúngica os hospedeiros induzidos pelas séries de reações enzimáticas do patógeno desenvolve atividades impedindo que sua própria protease seja ativada, levando à formação de substâncias tóxicas quinonas reativas e

melanina (Cerenius et al., 2008). Esses substratos tóxicos podem ajudar na morte de patógenos microbianos e são eficazes contra algumas infecções fúngicas (Binggeli et al., 2014).

Em contrapartida, os fungos evoluíram para combater essas defesas, secretando moduladores imunológicos para perturbar o hospedeiro e reimprimir a protease (Qu e Wang, 2019). Os fungos entomopatogênicos secretam uma ampla variedade de compostos durante a invasão, incluindo bassianin, bassiacridin, oosporeinas, ciclosporinas e destruxinas (Gibson et al., 2014; Molnar et al., 2010). Alguns destes metabolitos são responsáveis pela virulência e especificidade do hospedeiro. Por exemplo, *Metarhizium ssp*, inibem a expressão de genes que codificam AMPs e bloqueam a fagocitose (Chen et al., 2014).

As interações entre insetos hospedeiros e patógenos através dessas interações promovem evolução contínua de ambos os organismos e desencadeia uma série de reações no inseto tendendo a ser os efeitos subletais (Wertheim, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ahmad S, Ansari MS. (2013) Acute toxicity and sub-lethal effects of a pyrethroid (cypermethrin) on survival, development and fitness of *Helicoverpa armigera*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 46:1726–1739.

Ali A, Choudhury RA. (2009) Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection** 4:99-106.

Alves SB, Lecuna RE. (1998) Epizootiology aplicada ao controle microbiano de insetos In: Alves SB.; (ED). Controle microbiano de insetos. 167p. 2º edição ed. Piracicaba FEALQ.

Alvi AHK, SAYYED AH, NAEF M, ALI M. 2012. Field evolved resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. **PLoS One** 7:1-9.

Ávila JC, Vivian LM, Tomquelski GV. (2013) Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, Lemaître B. (2014) Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. **PLoS Pathog** 10:40-67.

Borges LR. (2007) Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycota) para o controle de *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae) em erva-mate, *Ilex paraguariensis* St.-Hil. (Aquifoliaceae). 102f. **Tese** (Doutorado em Entomologia) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Bouwer G, Nardini L, Duncan FD. (2009) *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae that survive sublethal doses of nucleopolyhedrovirus exhibit high metabolic rates. **Journal of Insect Physiology** 55:369–374.

Bués R, Bouvier JC, Boudinhon L. (2005) Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. **Crop Protection** 24:814-820.

Bussato GR, Grützmacher AD, Garcia MS, Zotti MJ, Nörnberg SD, Magalhães TR, Magalhães JB. (2006) Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, Santa Maria 36:15-20.

Cerenius L, Lee BL, Soderhall K. (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends Immunol** 29: 263-271.

Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC. (2002) Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycotina: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. **Genome** 45:125-132.

Conab. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos: safra 2017/2018, quarto levantamento, janeiro 2018. Brasília, DF, 2018. V 5.n 4. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra_degraos/item/download/12568_90833562417b6fb0225db3d1a5fc19a1, Acesso em: 08 de maio 2019.

Costa VHD. (2015) Testes genéticos e biológicos de baculovírus coletados em *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. 40f. (**Dissertação** – Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

Chandler D, Davidson G. (2005) 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** 98:1856-1862.

Chen XR, Hu QB, Yu XQ, Ren SX. (2014) Effects of destruxins on free calcium and hydrogen ions in insect hemocytes. **Insect Sci** 21:31-38.

Chougule NP, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS. (2005) Gene expression patterns

of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 35:355-367.

Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T. (2013) Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 43:110-113.

Deshpande GC, Thapa YRB. (2000) Monitoring and management of tomato fruitworm (*Helicoverpa armigera* Hubn.) in Chitwan condition. pp. 177-180. In: F. P. Neupane (ed) **Research report** 18:1995-2000.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81–106.

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

Dowd PF, Vega FE. (2003) Autodissemination of *Beauveria bassiana* by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to overwintering sites. **Biocontrol Science and Technology** 13:65–75.

Evans CJ, Banerjee U. (2003) Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. **Blood Cells Mol. Dis** 30:223-228.

Fan Y, Kruer SN, Keyhanin. (2011) High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology** 106:274-279.

Faria MRD, Wraight SP. (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control** 43:237–256.

Fathipour Y, Sedaratian A. (2013) Integrated management of *Helicoverpa armigera* in soybean cropping systems. In: Elshemy HA. (Ed.). **Soybean pest resistance** 22:231-280.

Fravel, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual review of phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.

Fitt GP. (1989) The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology** 34:17-52.

Gibson DM, Donzelli BG, Krasnoff SB, Keyhani NO. (2014) Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural product reports** 31:1287-1305.

Goettel MS, Eilenberg J, Glare T. (2010) Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Laurence IG, Sarjeet SG (Eds). Insect control: **Biological and synthetic Agents**. 1:387-437.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA. (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial diet. **Journal of economic entomology** 69:487-488.

Guedes JVC, Arnemann JÁ, Pirini CR Mello AA, Rohrig A, Stacke RF, Machado MRR. (2013) *Helicoverpa armigera*: da invasão ao manejo da soja. **Revista plantio direto** 137/138: 24- 35.

Hari NS, Mahal MS. (2008) Sub-lethal influences of different insecticides on oviposition preference of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton in relation to altered plant morphology. **International journal of pest management** 54:181–187.

Hartenstein V. (2006) Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. Annu. **Review of Cell and Developmental Biology** 22:677-712.

Ignacimuthu S, Jayaraj S. (2003) Ecofriendly approaches for sustainable pest management. **Current Science** 84:10-25.

Jarrahi A, Safavi SA. (2016) Fitness costs to *Helicoverpa armigera* after exposure to sub-lethal concentrations of *Metarhizium anisopliae* sensu lato: Study on F1 generation. **Journal of Invertebrate Pathology** 138:50–56.

Jaronski ST. (2014) Mass production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In: Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI (Eds). Mass Production of

Beneficial Organisms. **Journals Elsevier** 357-413.

Jayaraj S, Reed W, Kumble V. (1981) Biological and ecological studies of *Heliothis*. In Proceedings of the International Workshop on *Heliothis* Management. **Icrisat Center** 2:15-20.

Kalvnadi E, Mirmoayed A, Alizadeh M, Pourian HR. (2018) Sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* increase fitness costs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) offspring. **Journal of Invertebrate Pathology** 43:1-9.

Kulkarni SA, Ghormade V, Kulkarni G, Kapoor M, Chavan SB, Rajendran A, Patil SK, Shouche Y, Deshpande MV. (2008) Comparison of *Metarhizium* isolates for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea. **Biocontrol Science and Technology** 18:809– 828.

Kuss CC, Roggia CRK, Basso CJ, Oliveira MCN, PIAS CHO, Roggia S. (2016) Controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51:527-536.

Lacey AW. (2017) **Microbial Control of insect and Mite Peste**: From Theory to Practice. (Ed.). Copyright: Elsevier Inc. All rights reserved. 56p.

Lammers J, Macleod A. (2007) Report of a Pest Risk Analysis, *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). Plant Protection Service, the Netherlands, and Central Science Laboratory, United Kingdom, Joint Pest Risk Analysis for *Helicoverpa armigera*: **Manual de orientação European Union** ,18 p. (Série Manuais.)

Leite NA, Pereira AA, Corrêa AS, Zucchi M, Omoto C. (2014) Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old-World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **Plos one** 9:1-9.

Leite OSM, Iede TE, Penteado CRS, Zaleski MRS, Carmargo MMJ, Ribeiro DR. (2011) Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Hedypathes betulinus* e avaliação da persistência. **Floresta** 41:619-628.

Lemaitre B, Hoffmann J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Nature Reviews Immunology** 25:697-743.

Lu HL, St- Leger. (2016) Insect Immunity to entomopathogenic Fungi. **Advances in Genetics** 94:251–285.

Marzban R, He Q, Liu X, Zhang Q. (2009) Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Invertebr Pathol** 101:71–76.

Mckenzie, J.A. (2000) The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide resistance phenotype. **Bulletin of Entomological Research**. 10:3-7.

Meadow R, Vandenberg JD, Shelton AM. (2000) 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** 10:479–485.

Mensah RK. (1996) Supresssion of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology** 35:323-329.

Meyling NV, Eilenberg J. (2007) Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems e Environment** 113:336–341.

Michael G. (2008) The insect cellular immune response. **Insect Sci** 15:1-14.

Mishra J, Tewari S, Singh S, Arora NK. (2015) Biopesticides: Where we stand? In: Arora, N.K. (Ed.), Plant microbes' symbiosis. **Applied facets springer** 8:37–75.

Moraes IO, Capalbo DMF. (1986) Produção de bactérias entomopatogênicas. In: Alves SB. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba. 170p.

Naher P, Kulye M, Yadav P, Hassani M, Tour U, Keller S, Deshpande MV. (2008) Comparative evaluation of indigenous fungal isolates, *Metarhizium anisopliae*

M34412, *Beauveria bassiana* B3301 and *Nomuraea rileyi* N812 for the control of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on chickpea. **Journal Mycol. Plant Pathol** 33:372-377.

Naseri B, Fathipour Y, Moharramipour S, Hosseininaveh V. (2011) Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. **Journal of Agricultural Science and Technology** 13:17-26.

Nguyen NTH, Borgemeister C, Poehling HM, 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.

Oliveira, FEB. (2008) Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a metaflumizone na cultura do milho: bases para manejo da resistência. 57f. (**Dissertação**- Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Pagliosa MMR, Santos HR, Diodato MA. (1994) Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825), praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St.-Hil. **Agrárias** 1: 229 - 231. Edição Especial.

Patil S, Bashasab F, Vijaykuma R, Basavanagou D, Kuruvinashetti MS, Patil BV. (2006) Genetic relatedness among *Helicoverpa armigera* (Hübner) occurring on different host plants as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Asia Pacific Entomology** 9:227-233.

Qu S, Wang S. (2018) Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental e Comparative Immunology** 83:96–103.

Rijal PJ, Dhoj GCY, Thapa BR, Kafle L. (2008) Efficacy of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Helicoverpa armigera* in Chickpea, under field conditions in Nepal. **Biocontrol** 28:249-258.

Roberts DWST, Leger RJ. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect

pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology** 44:1–70.

Santos LQ, Casagrand MM, Specht A. (2018) Morphological characterization of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). **Neotrop Entomol** 4:1-12.

Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulilian GR, Bandani AR, Butt TM. (2016) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiol** 270:116–123.

Schrank A, Vainstein MH. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon** 56:1267-1274.

Sekulic R, Tatjana K, Masirevic S, Vajgand D, Gordana F, Radojicic S. (2004) Incidence and damage of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner.) in Vojvodina Province in 2003. **Biljni Lekar Plant Doctor** 32:113-124.

Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK. (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of invertebrate pathology** 88:1-7.

Sharma PK, Kumar U, Vyas S, Sharma S, Shrivastava S. (2012) 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** 5:44-46.

Silva SL. (2017) Monitoramento, Bioecologia e Controle Microbiano de *Helicoverpa armigera* (HUBNER, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) no Estado de Alagoas, Brasil. (**Dissertação** – Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas Centro de Ciências Agrária, Rio Largo - AL.

Silva IHS, Gómez I, Sánchez J, Martínez CDL, Valicente FH, Soberón M, Bravo A, Polanczyk AR. (2019) Identification of midgut membrane proteins from different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. **Plos one** 13:1-12.

Specht A, Sosa-Gómez DR. (2013) Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48:689-692.

Sosa-Gómez DR, Takachi M, Almeida AMR. (2011) Variabilidade de resposta de subpopulações de *Euschistus heros* (F.) a mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina. In: Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, São Pedro, SP. Londrina: Embrapa Soja. 81p.

Sosa-Gómez DR, Specht A, Paula-Moraes VS, Lopes-Lima A, Yano SAC, Micheli A, Morais GFO, Gallo P, Pereira RVS, Salvadori RJ, Botton M, Zenker MM, Azevedo-Filho WS. (2016) Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** 60:101–104.

Storch G, Loeck A, Remor M, Peloia P. (2014) Efeitos subletais de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), utilizados na cultura do milho. **Ciência Agraria Paranaensis** 13:71-79.

Suzana SC, Rosa FC, Alves LF, Salvador RJ. (2018) Consumption and use of soybean by the caterpillar *Helicoverpa armigera*. **Ciência Rural** 48:1-12.

Thomas MB, Read AF. (2007) Fungal bioinsecticide with a sting. **Nature Biotechnology** 25:1367-1368.

Thungrabeab M, Tongma S. (2007) Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsa) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) KMITL. **Science Technology** 7:8-12.

Tanada Y, Kaya HK. (1993) **Insect Pathology**. New York: Academic. 666p.

Torres-Vila LM, Rodriguez-Molina C, Plasencia AL, Bielza-lino P, Rodriguez DRA. (2002) Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: status and agroecological perspective. **Ecosystems and Environment** 93:55-65.

Valanne S, Wang JH, Ramet M. (2011) The *Drosophila* Toll signaling pathway. **Journal of Immunol** 186:649-656.

Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller, Koike M, MANIANIA NK, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE. (2009) Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. **Fungal Ecology** 2:149- 159.

Vieira TP, Oliveira NTL, Alves LAE. (2014) Controle biológico de insetos utilizando *Metarhizium anisopliae*: aspectos morfológicos, moleculares e ecológicos. **Ciência Rural** 44:645-651.

Vickers RA, Furlong MJ, White A, Pell JK. (2004) Initiation of fungal epizootics in diamondback moth populations within a large Weld cage: proof of concept for auto-dissemination. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 111:7–17.

Wang C, St-Leger RJ. (2006) A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103:6647–6652.

Wertheim B. (2015) Genomic basis of evolutionary change: evolving immunity. **Frontiers Genetics** 6:222.

Zimmerman G. (1993) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science** 37:375-379.

CAPÍTULO 2- EFEITO LETAL E SUBLETAL DE ISOLADOS FÚNGICOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorok. E *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vüillemin EM *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO- *Helicoverpa armigera* causa perdas significativas em diversas culturas, o que aumentou a frequência de aplicações de inseticidas químicos, com prejuízos para o meio ambiente e rápida seleção de indivíduos resistentes. Bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos são uma alternativa viável para minimizar os efeitos adversos do uso inadequado do controle químico. *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* apresentam ampla distribuição e alta variabilidade genética, o que possibilita a seleção de isolados virulentos para determinada espécie. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a interação de lagartas de *H. armigera* com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para isso foram confeccionadas tabelas de vida e realizados testes de mortalidade, efeitos subletais e virulência com 200 lagartas do 2º ínstar de *H. armigera*. A seleção dos isolados considerou-se a mortalidade confirmada e a análise estatística foi realizada no programa SAS, e quando significativa as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os isolados que apresentaram mortalidade confirmada superior a 80% até o sétimo dia de avaliação foram selecionados para etapa posterior do estudo. A virulência foi mensurada pela estimativa da CL₅₀, com emprego da análise de Probit. Nos efeitos subletais utilizou-se o procedimento de bootstrap para estimar as médias e erro padrão dos parâmetros biológicos, tempo de desenvolvimento, fecundidade e longevidade das lagartas sobreviventes aos tratamentos. A mortalidade para *B. bassiana* variou entre 45-100% e para *M. anisopliae* de 40-90%, dependendo do isolado testado. Na estimativa da CL₅₀ houve variações entre os isolados *B. bassiana* ($1,4 \times 10^6 - 4,5 \times 10^4$ conídios. mL⁻¹), *M. anisopliae* ($6,8 \times 10^5 - 5,6 \times 10^6$ conídios. mL⁻¹). Os parâmetros longevidade, fecundidade e sobrevivência, foram afetados em todos os tratamentos; com acréscimo (*M. anisopliae* ESALQ 1051 e *B. bassiana* ARSEF 1149 ou redução (*B. bassiana* IBCB 170), do período pupal. As taxas intrínsecas (*r*) e finitas (λ) de aumento e taxas líquidas (R0) e brutas (GRR) de reprodução, foram significativamente reduzidas para todos os tratamentos. O peso de pupa foi reduzido para os indivíduos tratados com os fungos e foram observadas deformações nas pupas de *H. armigera* cuja lagartas foram tratadas com *B. bassiana*. Os isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* resultam em efeito adverso na biologia do inseto, quando expostos a concentração subletal. Essas interferências são traduzidas para custos adaptativo, sobrevivência e reprodução, causando a diminuição dos parâmetros da tabela de vida. Assim, os fungos apresentam um alto potencial para controle de *H. armigera*.

Palavra-chave: Muscardine branca, Muscardine verde, patogenicidade, virulência, efeitos subletais, tabela de vida.

CHAPTER 2- LETHAL AND SUBLETHAL EFFECTS OF FUNGAL ISOLATES OF *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. And *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vüillemin IN *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT- *Helicoverpa armigera* causes significant losses in several cultures, which has increased the frequency of chemical insecticide applications, with damage to the environment and rapid selection of resistant individuals. Bioinsecticides based on entomopathogenic fungi are a viable alternative to minimize the adverse effects of inappropriate use of chemical control. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* have wide distribution and high genetic variability, which allows the selection of virulent isolates for a given species. Therefore, the objective of this work was to evaluate the interaction of *H. armigera* caterpillars with isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. For that, life tables were made and tests of mortality, sublethal effects and virulence were performed with 200 caterpillars of the 2nd instar of *H. armigera*. The selection of the isolates was considered confirmed mortality and the statistical analysis was performed in the SAS program, and when significant, the means were compared using the Tukey test at 5% probability. The isolates with confirmed mortality greater than 80% up to the seventh day of evaluation were selected for a later stage of the study. Virulence was measured by the LC50 estimate, using Probit analysis. In the sublethal effects, the bootstrap procedure was used to estimate the means and standard error of the biological parameters, development time, fertility and longevity of the caterpillars surviving the treatments. Mortality for *B. bassiana* varied between 45-100% and for *M. anisopliae* 40-90%, depending on the tested isolate. In the LC50 estimate, there were variations between *B. bassiana* isolates (1.4×10^6 - 4.5×10^4 conidia. ML-1), *M. anisopliae* (6.8×10^5 - 5.6×10^6 conidia. ML- 1). The parameters longevity, fertility and survival, were affected in all treatments; with an increase (*M. anisopliae* ESALQ 1051 and *B. bassiana* ARSEF 1149 or reduction (*B. bassiana* IBCB 170), of the pupal period. The intrinsic (r) and finite (λ) rates of increase and net (R_0) and crude rates (GRR) of reproduction, were significantly reduced for all treatments. The pupal weight was reduced for individuals treated with fungi and deformations were observed in the pupils of *H. armigera* whose caterpillars were treated with *B. bassiana*. *M. anisopliae* and *B. bassiana* result in an adverse effect on the insect's biology, when exposed to sublethal concentration, which interferes with adaptive costs, survival and reproduction, causing a decrease in the parameters of the life table. control potential for *H. armigera*.

Keywords: White muscardine, Green muscardine, Pathogenicity, Virulence, sublethal effects, life table.

1- INTRODUÇÃO

A lagarta do algodão, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das pragas mais importantes na agricultura mundial, com mais de 200 plantas hospedeiras (Devi et al., 2011; Ávila et al., 2013; Challa et al., 2013). Características como alta polífagia, capacidade reprodutiva e ampla distribuição geográfica levaram esse inseto à adaptação em diferentes agroecossistemas (Tay et al., 2013).

A severidade dos danos causados e a frequência de aplicações de inseticidas químicos para o controle dessa praga tem acelerado o desenvolvimento de resistência e aumentado os problemas ambientais (Yang et al., 2013). Alternativas eficientes para o controle dessa praga que seja menos agressivas ao meio ambiente, são necessárias, como o uso dos fungos entomopatogênicos. Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle em várias ordens de insetos-praga incluindo lepidópteros (Lacey, 2017). Além de demonstrar uma alta eficiência esses microrganismos têm sido usados em formulações devido à inocuidade ao homem, ambiente e aos inimigos naturais (Jaronski et al., 2014).

Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales), são generalistas de ampla distribuição geográfica, e frequentes em amostras de solos e plantas (Jaronski, 2007; Zimmermann, 2007; Botelho et al., 2019). Devido à ampla distribuição, alta variabilidade genética intraespecífica e espectro de ação (Goettel et al., 2010), os fungos apresentam possibilidade de seleção de isolados para o controle de determinado inseto-praga. *B. bassiana* e *M. anisopliae* já foram relatados para o controle de *H. armigera*, tanto com efeitos letais quanto subletais com avaliação dos parâmetros de taxa de sobrevivência, longevidade de adultos, razão sexual e fecundidade (Hari e Mahal, 2008; Ahmad e Ansari, 2013; Jarrahi, 2016).

Entretanto, entender os efeitos provocados por variações de isolados é necessário principalmente para avaliar estratégias e aumentar o número de possibilidades de isolados promissores, além de esclarecer o que provavelmente acontece a campo, onde dificilmente a dose necessária para causar a morte de um determinado produto alcançará diretamente a praga, existindo a possibilidade de os insetos serem expostos a concentrações subletais.

Logo para indicar se uma população vai aumentar ou diminuir quando exposta a concentrações são necessários dados de fertilidade e mortalidade dos insetos nos diferentes instares, bem como, a razão sexual da população. A tabela de vida com a inclusão do sexo masculino aumenta o conhecimento da composição populacional das pragas (Peroni e Hernández, 2011). Sendo assim, estudos do comportamento dos insetos frente a ação de isolados fúngicos são fundamentais para predizer o impacto de fungos entomopatogênicos na população da praga. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a interação de lagartas de *H. armigera* com isolados de *M. anisopliae* e de *B. bassiana* na concentração CL₅₀.

2- MATERIAIS e MÉTODOS

2.1 Criação de *H. armigera*

Uma população de *H. armigera*, proveniente da empresa Ouro fino Agrociência, São Paulo, Brasil, foi estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP-FCAV, São Paulo, Brasil.

As lagartas foram criadas individualmente em recipiente plástico transparentes (50 mL) contendo aproximadamente 50 g de dieta artificial (Greene et al., 1976), até a fase de pupa. As pupas foram mantidas em recipientes plásticos (11,5 de diâmetro e 3,5 cm de altura) com papel filtro, até a emergência dos adultos (machos e fêmeas). Esses foram transferidos para gaiolas de PVC (20 cm de diâmetro e 30 cm de altura), na face superior das gaiolas foi vedada com tecido “voile”, na face inferior foi apoiada em prato de plástico (28 cm de diâmetro) recoberto com papel filtro. Internamente a gaiola foi forrada com papel toalha como substrato para oviposição e os insetos adultos foram alimentados com algodão embebidos com solução de mel à 10%.

Os ovos foram coletados das gaiolas a cada três dias e transferidas inicialmente para um recipiente plástico transparente (500 mL), contendo aproximadamente 50g de dieta artificial, as lagartas foram individualizadas, após dez dias ao atingiam o terceiro ínstar. A criação foi mantida em sala climatizada sobre as condições de temperatura de 25°C, umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12 horas.

2.2 Preparo dos isolados fúngicos para realização dos bioensaios

Nos bioensaios foram utilizados 23 isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, proveniente da Collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF)-USDA, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" -(ESALQ, Piracicaba/SP) e do Instituto Biológico de Campinas (IBCB, Campinas- SP), (Tabela 1).

As suspensões de cada fungo utilizadas nos bioensaios foram preparadas a partir da raspagem dos conídios produzidos em meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar e 1.000 mL de água), e 0,002 µL de Tween 80®.

Após o preparo, cada solução fúngica passou por diluições seriadas, para a contagem de conídios utilizando o método de contagem na câmara de Neubauer (Alves e Moraes 1998), obedecendo um padrão de concentração de 10^8 conídios/ mL⁻¹ para cada tratamento.

2.3 Teste de viabilidade dos conídios

Para elaborar o teste de viabilidade, em cada placa de Petri foi colocada uma fina camada de BDA (aproximadamente 2,0 mL) e após a solidificação do meio, cada placa recebeu 0,1 mL das suspensões fúngicas, preparadas com cada isolado dos fungos, em 10 mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,02%. As suspensões foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalsky, flambada e devidamente resfriada. Posteriormente, as placas foram mantidas por 24 h em estufas B.O.D. a 25,5 °C e fotofase de 12 h. Após esse tempo, foi feita a observação das placas em microscópio ótico com aumento de 400 vezes para a contagem de 100 conídios, germinados e não germinados, estabelecendo-se uma proporção.

Tabela 1. Procedência e hospedeiro dos fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios para *Helicoverpa armigera*.

Isolados	Patógenos	Procedência	Hospedeiro
ARSEF 3293	<i>Metarhizium anisopliae</i>	México, MEX	<i>Spodoptera frugiperda</i>
ARSEF 1080	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Gainesville, USA	<i>Helicoverpa zea</i>
ESALQ 114	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Goiânia, GO	<i>Mahanarva posticata</i>
ESALQ 1051	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Porto Alegre, RS	<i>Solenopsis</i>
ESALQ 860	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Piracicaba, SP	<i>Macropsis</i> sp.
ESALQ 935	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Itabúna, BA	<i>Diatraea saccharalis</i>
IBCB 418	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Iporanga, SP	Solo mata atlântica
IBCB 383	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Araras, SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
IBCB 425	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Iporanga, SP	Lagarta
IBCB 364	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Córrego Rico, SP	Solo
ARSEF 1149	<i>Beauveria bassiana</i>	Córdoba, ARG	<i>Helicoverpa armigera</i>
ARSEF 1788	<i>Beauveria bassiana</i>	Spain, ES	<i>Helicoverpa virescens</i>
ESALQ 986	<i>Beauveria bassiana</i>	Piracicaba, SP	<i>Blatella germanica</i>
ESALQ 1289	<i>Beauveria bassiana</i>	Caçú, GO	<i>Leptopharsa heveae</i>
ESALQ 1075	<i>Beauveria bassiana</i>	Arapongas, PR	Solo
ESALQ 480	<i>Beauveria bassiana</i>	Cuiabá, MT	<i>Solenopsis invicta</i>
ESALQ 1288	<i>Beauveria bassiana</i>	Pontes e Lacerda, MT	<i>Rhynchophorus palmarum</i>
IBCB 36	<i>Beauveria bassiana</i>	S. J. do Rio Pardo, SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
IBCB 170	<i>Beauveria bassiana</i>	Goiânia, GO	<i>Cosmopolites</i> sp.
IBCB 38	<i>Beauveria bassiana</i>	Araras, SP	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 35	<i>Beauveria bassiana</i>	Cruz das Almas, BA	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 241	<i>Beauveria bassiana</i>	Pindamonhangaba, SP	<i>Oryzophagus oryzae</i>
IBCB 1363	<i>Beauveria bassiana</i>	Pariquera-Açu, SP	Solo de seringueira

2.4 Ensaio de mortalidade

Para os bioensaios foram utilizadas lagartas do 2º ínstar de *H. armigera* provenientes da criação estoque do LCMAP, criadas até a quinta geração. Os ensaios foram constituídos de 23 tratamentos, sendo 10 isolados de *M. anisopliae*, 13 de *B. bassiana* e 1 controle. Para cada tratamento foram individualizadas 200 lagartas, em recipientes de polietileno (18 mm x 30 mm) foi acondicionado dieta artificial (Greene et al. 1976) e em seguida com o auxílio de uma pipeta de 10 µL pipetou-se 0,2 µL do inóculo sobre as lagartas.

Para a testemunha realizou-se o mesmo procedimento substituindo-se a suspensão fúngica por água destilada mais 0,02 (v/v) de Tween 80®. Os recipientes plásticos com os insetos foram fechados e mantidos em sala

climatizada. As avaliações foram realizadas após três dias de inoculação, registrando-se o número de insetos mortos total no final de sete dias, as lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao serem tocadas por um pincel de cerdas macias.

Para confirmação da mortalidade pelo patógeno, os insetos foram lavados em álcool 70% por 10 segundos e enxaguados em água destilada por 20 segundos para descontaminação externa, em seguida, acondicionados em placas de Petri com câmara úmida por 15 dias, tornando possível a visualização da extrusão do patógeno (confirmação da infecção), ou não. Os isolados que causaram mortalidade confirmada superior a 80% até o sétimo dia de avaliação foram selecionados para etapa posterior do estudo.

2.5 Estimativa da concentração letal média (CL₅₀) de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre lagartas de *H. armigera*

Para estimar a concentração letal média (CL₅₀), lagartas do segundo ínstar de *H. armigera* foram expostas a sete concentrações (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios mL⁻¹) dos isolados selecionados anteriormente nos testes de mortalidade. Para cada tratamento foram individualizadas 100 lagartas. A metodologia para estes bioensaios, armazenamento e avaliação foram idênticos as utilizados nos testes de mortalidade.

2.6 Avaliação dos Efeitos Subletais

Um total de 50 lagartas sobreviventes a exposição das concentrações de CL₅₀ dos isolados mais promissores (*B. bassiana* ARSEF 1149, ARSEF 1788, ESALQ 986, ESALQ 1288, IBCB 36, IBCB 170) (*M. anisopliae* ESALQ 860, ESALQ 1051), foram monitoradas diariamente em cada tratamento, para avaliação dos parâmetros biológicos como: duração dos instares (dias), peso das lagartas (mg), peso de pupa (mg), razão sexual, fecundidade, viabilidade dos ovos (%), e longevidade de adultos (macho e fêmea).

Para verificar se houve interferência dos tratamento sobre os pesos das lagartas e pupas foi realizada a pesagem em uma balança analítica (SHIMADZU-ATY224®) de todas as lagartas do 7º dia, pré-pupa e pupas. A sexagem das pupas foi realizada de acordo com a observação da abertura anal e genital segundo Zenker et al (2007), com auxílio de uma lupa (ZEISS-STEMI 508®),

separando os machos das fêmeas estabelecendo a formação dos casais para avaliar o período pré-oviposição (APOP: período entre o surgimento do adulto e a primeira oviposição), pré-oviposição total (TPOP: período do ovo à primeira reprodução). Os casais formados foram mantidos nas condições já descritas na criação da espécie. A oviposição e a longevidade foram registradas diariamente.

Para análise das variáveis biológicas de *H. armigera* e confecção da tabela de vida os dados brutos do tempo de desenvolvimento, sobrevivência, fecundidade diária, longevidade de macho e fêmea foram analisadas com base na tabela de vida. Nestas avaliações foram considerados todos os indivíduos testados incluindo os que morreram durante o desenvolvimento do estágio imaturo (Chi e Liu, 1985; Chi, 1988).

Parâmetros de taxa intrínseca de crescimento populacional (r), taxa finita de aumento populacional, (λ), taxa líquida de reprodução, (R_0), duração média de uma geração (T) e a taxa bruta de reprodução (GRR) foram estimados utilizando a metodologia de Chi e Liu (1985), de acordo com:

$$\sum_{x=0}^{\infty} e^{-r(x+1)} l_x m_x = 1 \quad (1)$$

$$l_x = \sum_{j=1}^{\beta} S_{xj} \quad (2)$$

$$m_x = \frac{\sum_{j=1}^{\beta} S_{xj} f_{xj}}{\sum_{j=1}^{\beta} S_{xj}} \quad (3)$$

Onde, β é o número de estágios de vida; (sx_j) é a taxa de sobrevivência específica do estágio etário, considerando-se a diferença e o desvio padrão; (lx) é a taxa de sobrevivência específica da idade; (fx_j) é a fecundidade específica do estágio etário; (mx) é a fecundidade específica da idade.

2.7 Análise estatística

Para a seleção dos isolados utilizou-se o Delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 24 tratamentos e 200 repetições, sendo cada lagarta considerada uma repetição. A análise estatística foi realizada no programa SAS (University, 2002) e quando significativa as medias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a estimativa da CL_{50} , os dados de mortalidade obtidos nas diferentes concentrações foram submetidos à análise de Probit, utilizando o POLO PC Software (Leora-software, 1987).

Os efeitos subletais utilizou-se o procedimento de bootstrap para estimar as variações, médias e erro padrão dos parâmetros biológicos do tempo de desenvolvimento, fecundidade e longevidade, utilizando 100.000 bootstraps. A comparação dos parâmetros populacionais de *H. armigera* em tratamentos fúngicos e testemunha foi realizado com o Paired Bootstrap Test ($p < 0,05$) com base no intervalo de confiança de diferença (IC = 95%) (Efron e Tibshirani, 1993; Polatakko et al. 2015) usando o programa TWOSEX-MS-Chart (Chi, 2016).

3- RESULTADOS

3.1 Teste de mortalidade

Houve diferença na mortalidade confirmada entre os isolados para *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre lagartas do segundo ínstar de *H. armigera*, com as melhores médias para os tratamentos IBCB 425, ESALQ 860 para *M. anisopliae* e IBCB 1363, IBCB 36 para *B. bassiana* (Figura 1). Os oito isolados que causaram mortalidade confirmada superior a 80% foram utilizados em testes de posteriores da estimativa da CL_{50} .

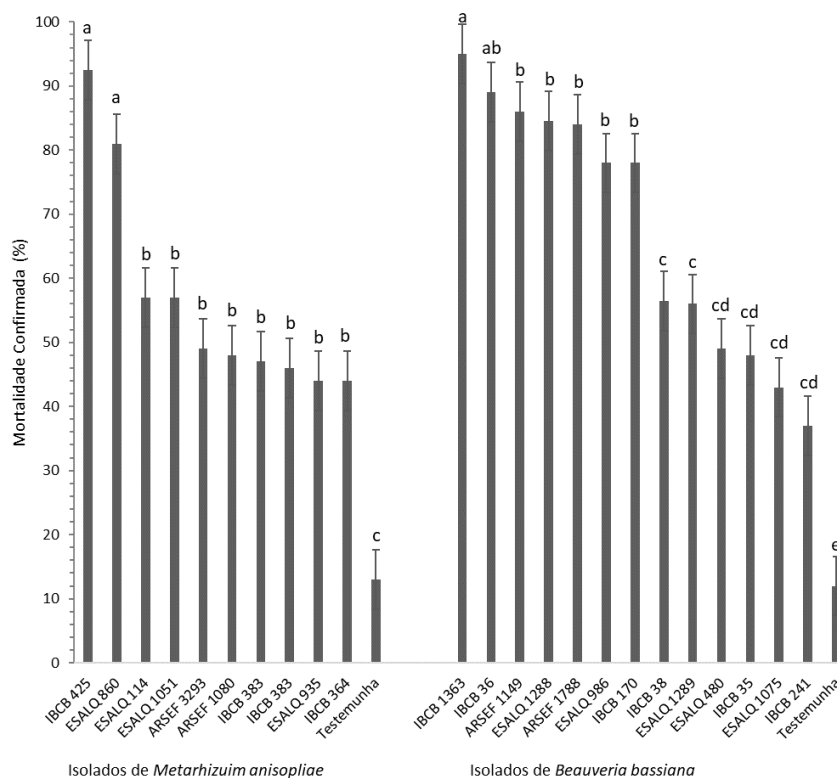


Figura 1. Mortalidade confirmada de lagartas do segundo ínstar de *Helicoverpa armigera* causada por *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Viabilidade de conídios

A viabilidade dos conídios entre os isolados variou de 42,0 a 98,0%. Os isolados ARSEF 1149, ESALQ 1288, IBCB 36, IBCB 170 e IBCB 1363 do fungo *B. bassiana* apresentaram além de alta virulência o maior número de conídios viáveis. Para o fungo *M. anisopliae* os isolados que apresentaram maior número de conídios viáveis foram ESALQ 860, ESALQ 1051 e IBCB 425 que diferiu dos demais apresentando conídios mais viáveis, já que no teste de mortalidade apresentou um mesmo grau de virulência (Figura 1).

3.3 Estimativa de CL₅₀

Tabela 2. Estimativa da CL₅₀ dos isolados dos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em larvas do segundo instar de *H. armigera*, utilizando o programa Polo-PC.

<i>B. bassiana</i>				
Tratamentos	CL ₅₀ (conídios. mL ⁻¹)	Slope ± SE	N	χ ²
ARSEF 1149	1,4 × 10 ⁶ (5,8 × 10 ⁵ – 8,1 × 10 ⁶)	0,36 ± 0.05	100	8,39
ESALQ 1288	1,5 × 10 ⁵ (3,3 × 10 ⁴ – 5,6 × 10 ⁶)	0,46 ± 0.05	100	3,88
IBCB 36	2,9 × 10 ⁵ (1,8 × 10 ⁴ – 7,1 × 10 ⁶)	0,55 ± 0.05	100	2,99
IBCB 170	5,4 × 10 ⁴ (2,8 × 10 ³ – 5,1 × 10 ⁶)	0,29 ± 0.05	100	6,26
IBCB 1363	4,5 × 10 ⁴ (2,3 × 10 ³ – 8,3 × 10 ⁶)	0,25 ± 0.05	100	1,75
<i>M. anisopliae</i>				
IBCB 425	6,8 × 10 ⁵ (1,4 × 10 ⁴ – 2,7 × 10 ⁷)	0,30 ± 0.05	100	7,2
ESALQ 860	7,8 × 10 ⁶ (1,8 × 10 ⁶ – 3,7 × 10 ⁷)	0,22 ± 0.05	100	9,25
ESALQ 1051	5,6 × 10 ⁶ (2,1 × 10 ⁷ –1,4 × 10 ⁸)	0,23 ± 0.05	100	4,68

N: Número de lagartas testadas, χ²: valor do Chi-squared, CL₅₀: concentração letal, conídio. mL⁻¹ totais.

3.4 Longevidade e fecundidade de *H. armigera*

Utilizando o método de inicialização por pares (PBT Pooled), a duração da oviposição foi afetada em dois isolados dos três testados para *M. anisopliae* ESALQ 860 (3,59 dias) e ESALQ 1051 (4,2 dias), quando comparados com a testemunha (5,2 dias) porém não apresentaram diferença significativa (Tabelas 3 e 4).

A duração dos estágios imaturos (larva) diferiu para cada isolado, com redução ou aumento do período larval (Tabela 3). O período de pré-pupa e pupa para todos os isolados fúngicos diferiram da testemunha com aumento significativo na duração das duas fases. A longevidade dos machos e fêmeas aumentou em todos os tratamentos: ESALQ 1051 (63,93 e 65,42 dias); ESALQ 860 (53,05 e 60,71 dias) e IBCB 425 (47,52 e 51,64 dias), sendo mais longa do que a testemunha (45,07 e 48,07 dias).

Tabela 3. Tempo de desenvolvimento (dias) de diferentes estágios, longevidade, fecundidade, período pré-oviposição e período pré-oviposição total de lagartas de *Helicoverpa armigera* infectada com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* e testemunha (como grupo não tratado).

Parâmetro	Tratamento com <i>Metarhizium anisopliae</i>			
	IBCB 425	ESALQ 860	ESALQ 1051	TESTEMUNHA
Ovo (dias)	3.00 ± 0.00 a	3.00 ± 0.00 a	3.00 ± 0.00 a	2.89 ± 0.00 a
Lagartas (dias)	9.00 ± 0.00 d	14.7 ± 0.36 c	24.36 ± 0.16 a	17.00 ± 0.00 b
Pré-Pupa (dias)	10.39 ± 0.12 a	5.92 ± 0.16 b	5.26 ± 0.41b	2.00 ± 0.00 c
Pupa (dias)	16.00 ± 0.00 b	25.26 ± 0.22 a	25.04 ± 0.22 a	15.00 ± 0.25 b
Longevidade feminina adulta (dias)	47.52 ± 0.73 c	53.05 ± 0.69 b	63.93 ± 0.61 a	45.00 ± 0.72 c
Longevidade masculina adulta (dias)	51.64 ± 0.36 c	60.71 ± 0.74 b	65.42 ± 0.46 a	48.07 ± 0.39 c
Total Longevidade (dias)	47.7 ± 1.09 bc	48.88 ± 0.70 b	57.78 ± 0.19 a	46.66 ± 0.44 c
APOP (dias)	2.71 ± 0.12 a	2.41 ± 0.10 a	2.53 ± 0.13 a	2.70 ± 0.26 a
TPOP (dias)	40.71 ± 0.12 c	48.32 ± 0.25 b	58.8 ± 0.34 a	38.52 ± 0.58 c
Fecundidade (ovo/F ₁ fêmea)	411.52 ± 46.65 b	289.18 ± 21.42 d	308.27 ± 23.67 c	470.83 ± 24.5 a
Oviposição em dias	5.2 ± 0.51 a	3.59 ± 0.23 b	4.2 ± 0.42 b	5.2 ± 0.34 a

APOP: período pré-oviposição adulto, TPOP: período total pré-oviposição, ambos são calculados usando fêmeas que produziram ovos férteis. Os dias médios de oviposição são calculados apenas para os dias em que o número de ovos colocados foi maior que zero. Os erros padrão foram estimados usando 100.000 bootstraps e comparados usando o teste de bootstrap emparelhado com base no IC de diferenças. As médias seguidas por uma letra diferente dentro de cada linha são significativamente diferentes entre os tratamentos ($p < 0,05$, teste de autoinicialização emparelhado).

O tempo de desenvolvimento total da testemunha (46,66 dias) foi menor do que os tratamentos ESALQ 860 (48,88dias) e ESALQ 1051 (58,8dias). Entretanto para o isolado IBCB 425 não houve diferença (47,7dias). O tempo total de pré-oviposição (TPOP) nos tratamentos (ESALQ 860 e ESALQ 1051) foi significativamente maior do que na testemunha (38,52 dias) porém o tratamento IBCB 425 não diferiu da mesma. O tempo de pré-oviposição (APOP) não diferiu entre os tratamentos e a testemunha. A fecundidade média da fêmea diminuiu em todos os tratamentos em comparação ao controle. A viabilidade dos ovos foi reduzida de forma mais intensa no isolado IBCB 425 (60,14 %) (Tabela 3).

Para as lagartas expostas aos isolados de *B. bassiana* houve diferença na duração da oviposição quando comparado a testemunha (5,2 dias) (Tabela 4). No entanto, não houve diferença quando comparado entre os isolados. A duração dos estágios imaturos (larva e pré-pupa) diferiu entre os isolados, com aumento ou redução do período larval. O período pupal também foi afetado em todos os tratamentos com aumento ou redução quando comparado a testemunha.

A longevidade dos adultos em ambos os sexos foi afetada pelos tratamentos. Em alguns isolados o período foi reduzido e em outros houve aumento em relação a testemunha (45,00 para fêmeas e 48,07 para machos). A longevidade foi menor em três tratamentos IBCB 36 (35,16 dias); IBCB 170 (29,46 dias) e IBCB 1363 (42,78 dias), diferindo estatisticamente da testemunha (46,66 dias). Os isolados ARSEF 1149 (47,72 dias); ESALQ 1288 (47,08 dias) não diferiu da testemunha, (Tabela 4). O tempo de desenvolvimento total de pré-oviposição (TPOP) foi afetado pela maioria dos tratamentos. No isolado IBCB 36 (30,00) foi menor do que a testemunha (38,52), nos isolados ESALQ 1288 (48,88); IBCB 170 (40,36), foi maior que a testemunha (38,52) e nos isolados IBCB 1363 (37,53) e ARSEF 1149 (37,45) não diferindo da testemunha.

Tabela 4. Tempo de desenvolvimento (dias) de diferentes estágios, longevidade, fecundidade, período pré-oviposição e período pré-oviposição total de lagartas de *Helicoverpa armigera* infectada com diferentes isolados de *Beauveria bassiana* e testemunha (como grupo não tratado).

Parâmetro	Tratamentos com <i>Beauveria bassiana</i>					
	ARSEF 1149	ESALQ 1288	IBCB 36	IBCB 170	IBCB 1363	TESTEMUNHA
Ovo (dias)	3.00 ± 0.00 a	3.00 ± 0.00 a	2.90 ± 0.00 a	2.95 ± 0.00 a	3.00 ± 0.00 a	2.89 ± 0.00 a
Lagartas (dias)	13.88 ± 0.16 b	8.2 ± 0.21 c	5.76 ± 0.14 d	9.00 ± 0.00 c	15.00 ± 0.00 ab	17.00 ± 0.00 a
Pré-Pupa (dias)	2.6 ± 0.22 b	8.2 ± 0.21 a	8.71 ± 0.14 a	2.64 ± 0.14 b	3.32 ± 0.07 c	2.00 ± 0.00 b
Pupa (dias)	16.24 ± 0.06 b	16.56 ± 0.41b	11.00 ± 0.00 d	23.45 ± 0.19 a	15.35 ± 0.28 c	15.00 ± 0.25 c
Longevidade feminina adulta (dias)	46.00 ± 0.32 a	41.29 ± 0.92 b	34.43 ± 0.20 c	45.27 ± 0.27 a	42.6 ± 0.4 b	45.00 ± 0.72 a
Longevidade masculina adulta (dias)	49.07 ± 0.37 ab	50.06 ± 0.88 a	37.81 ± 0.49 c	47.18 ± 0.42 b	48.56 ± 0.34 b	48.07 ± 0.39 b
Total Longevidade (dias)	47.72 ± 0.32 a	47.08 ± 0.92 a	35.16 ± 0.86 c	29.46 ± 2.13 d	42.78 ± 0.67 b	46.66 ± 0.44 a
APOP (dias)	2.45 ± 0.19 b	3.44 ± 0.16 a	3 ± 0.0 a	2.36 ± 0.15 b	2.53 ± 0.13 b	2.70 ± 0.26 b
TPOP (dias)	37.45 ± 0.19 b	48.88 ± 0.35 a	30 ± 0.0 d	40.36 ± 0.15 b	37.53 ± 0.12 b	38.52 ± 0.58 bc
Fecundidade (ovo/F ₁ femêa)	221.23 ± 7.35 d	338.12 ± 31.86 b	250.05 ± 25.1 d	289.00 ± 45.07c	328.27 ± 44.39 b	470.83 ± 24.5 a
Oviposição em dias	4.18 ± 0.17 b	3.72 ± 0.23 c	3.14 ± 0.30 c	3.90 ± 0.31 bc	4.06 ± 0.31 b	5.2 ± 0.34 a

APOP: período pré-oviposição adulto, TPOP: período total pré-oviposição, ambos são calculados usando fêmeas que produziram ovos férteis. Os dias médios de oviposição são calculados apenas para os dias em que o número de ovos colocados foi maior que zero. Os erros padrão foram estimados usando 100.000 bootstraps e comparados usando o teste de bootstrap emparelhado com base no IC de diferenças. As médias seguidas por uma letra diferente dentro de cada linha são significativamente diferentes entre os tratamentos ($p < 0,05$, teste de autoinicialização emparelhado).

O período de pré-oviposição (APOP), para testemunha foi de 2,70 dias semelhante aos isolados ARSEF 1149 (2,45); IBCB 170 (2,36) e IBCB 1363 (2,53), no ESALQ 1288 (3,44) e IBCB 36 (3,00), foram significativamente diferentes dos demais. A fecundidade média da fêmea diminuiu em todos os tratamentos quando comparadas com a testemunha (470,83), porém não diferiram entre si para os isolados IBCB 1363 (328,27) e ARSEF 1149 (221,23); ESALQ 1288 (338,12) e IBCB 1363 (328,27). A viabilidade dos ovos foi reduzida principalmente no isolado IBCB 1363 (75,24 %).

3.5 Sobrevivência

A curva de sobrevivência de cada fase (S_{xj}) mostrou a probabilidade das lagartas de *H. armigera* sobreviverem em cada estágio após a exposição a todos os isolados fúngicos testados (Figura 2 e 3). A sobreposição de diferentes estágios em insetos tratados foi semelhante a testemunha, porém houve variação no tempo de sobreposição. A sobreposição entre diferentes curvas de sobrevivência no estágio de vida mostra variabilidade da taxa de desenvolvimento os isolados. A mortalidade das lagartas sobreviventes (50%) foi registrada no estágio de pupa tendo uma variação entre os isolados. A longevidade em cada fase variou entre cada indivíduo como demonstrados (Figura 2 e 3).

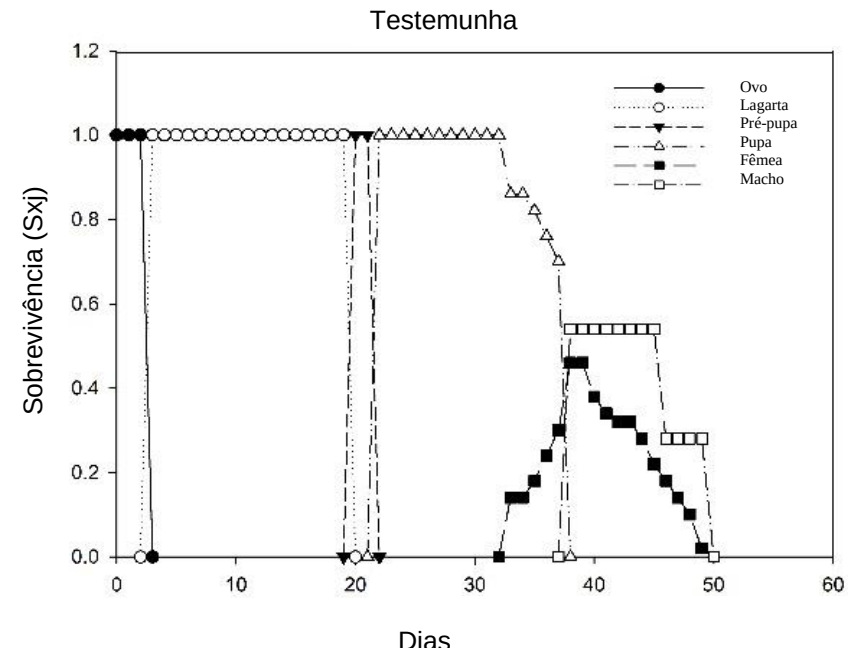
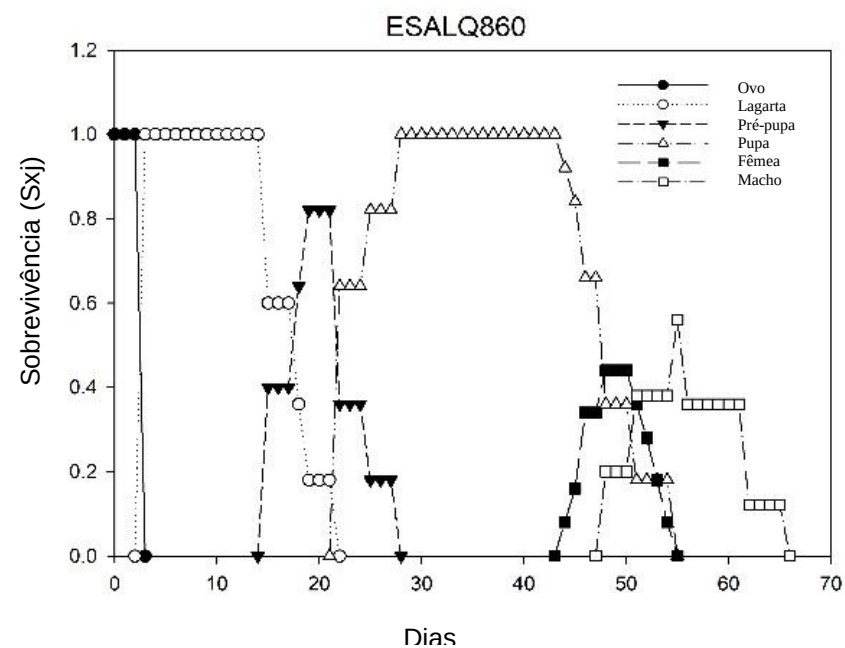
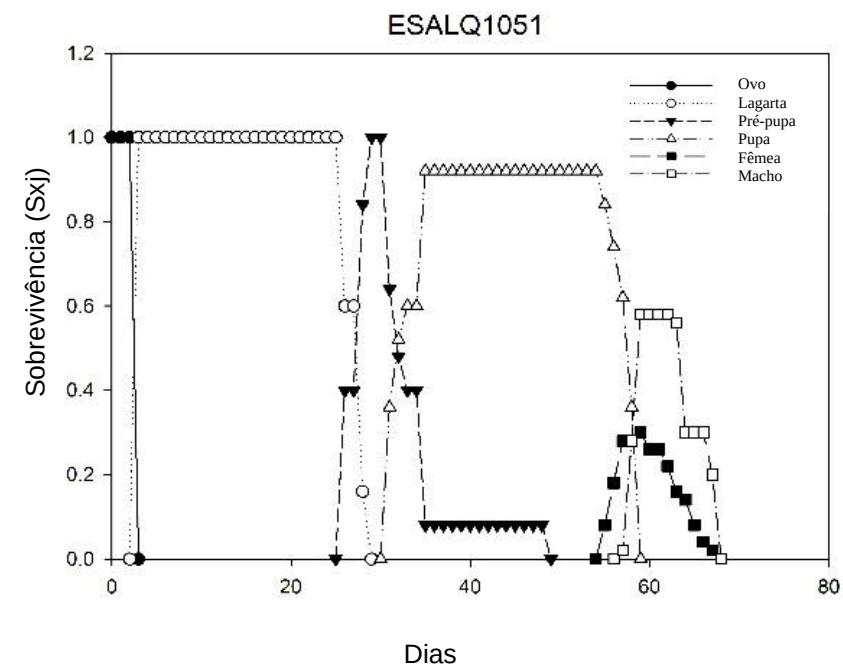
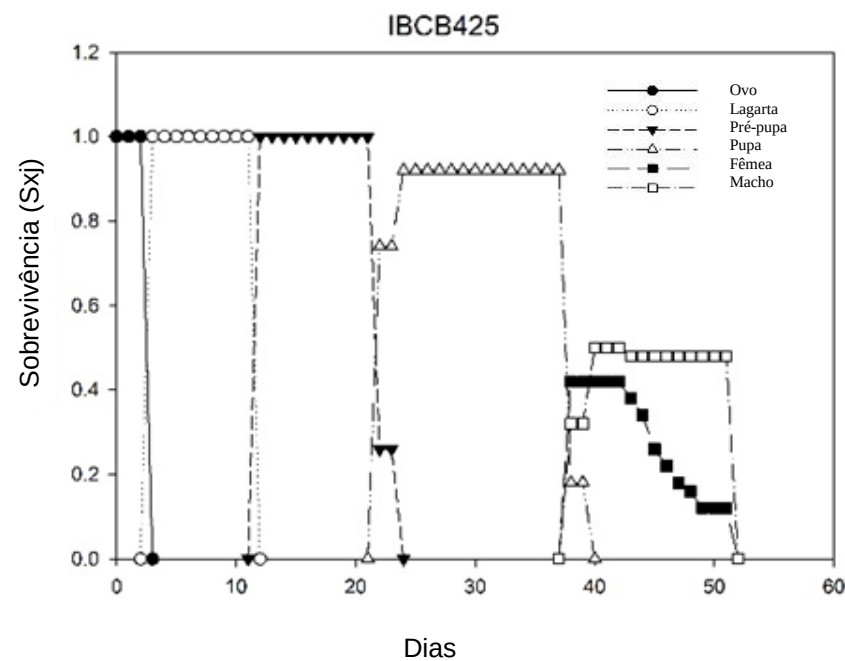


Figura 2. Sobrevivência (sxj) específica dos estágio de vida de *H. armigera* expostas as concentrações subletais de diferentes isolados de *M. anisopliae*.

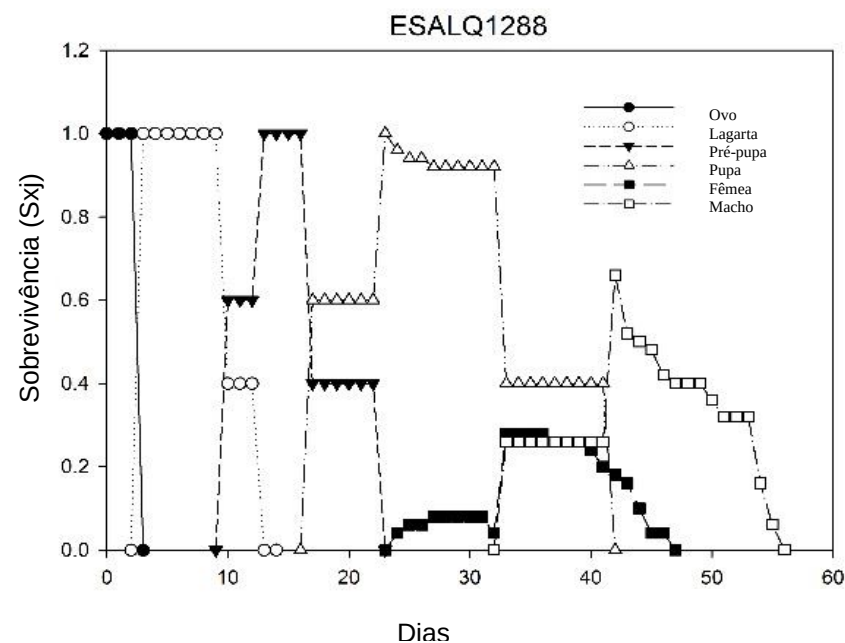
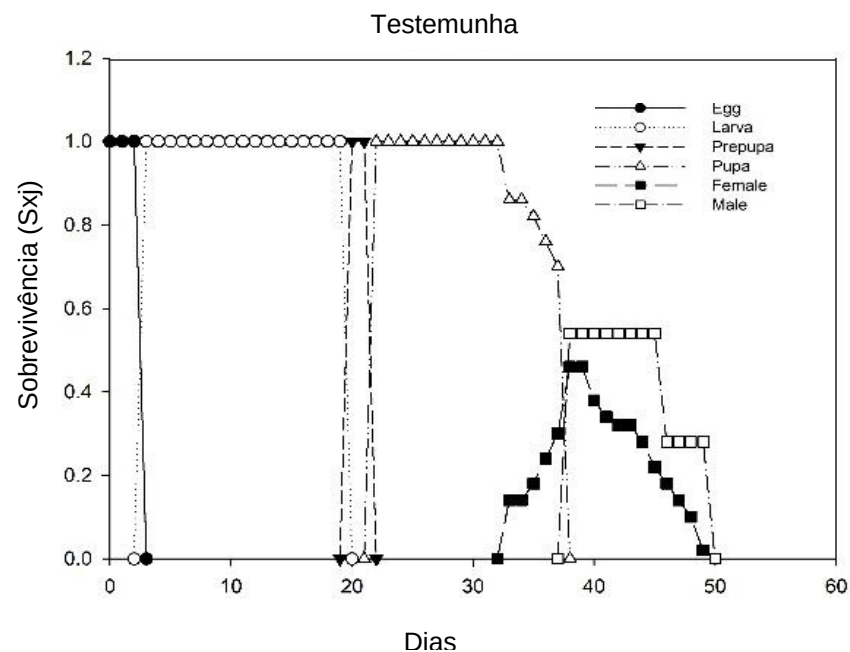
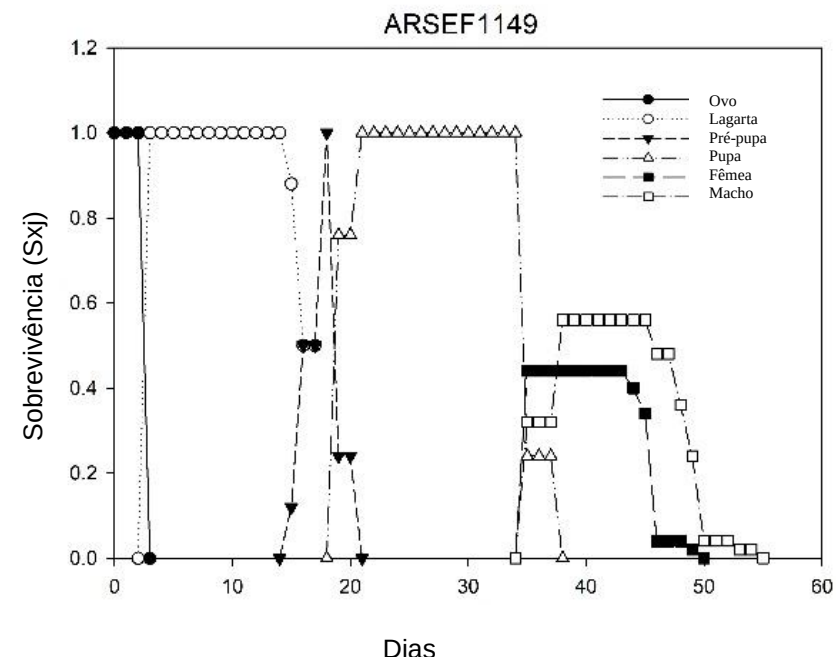
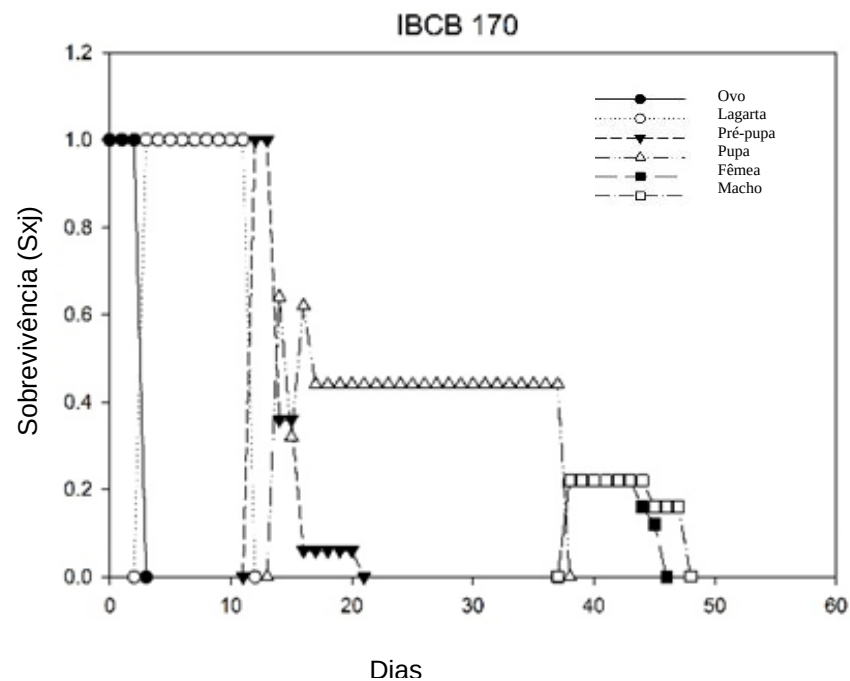


Figura 2. Sobrevivência (sxj) específica dos estágio de vida de *H. armigera* expostas as concentrações subletais de diferentes isolados de *M. anisopliae*.

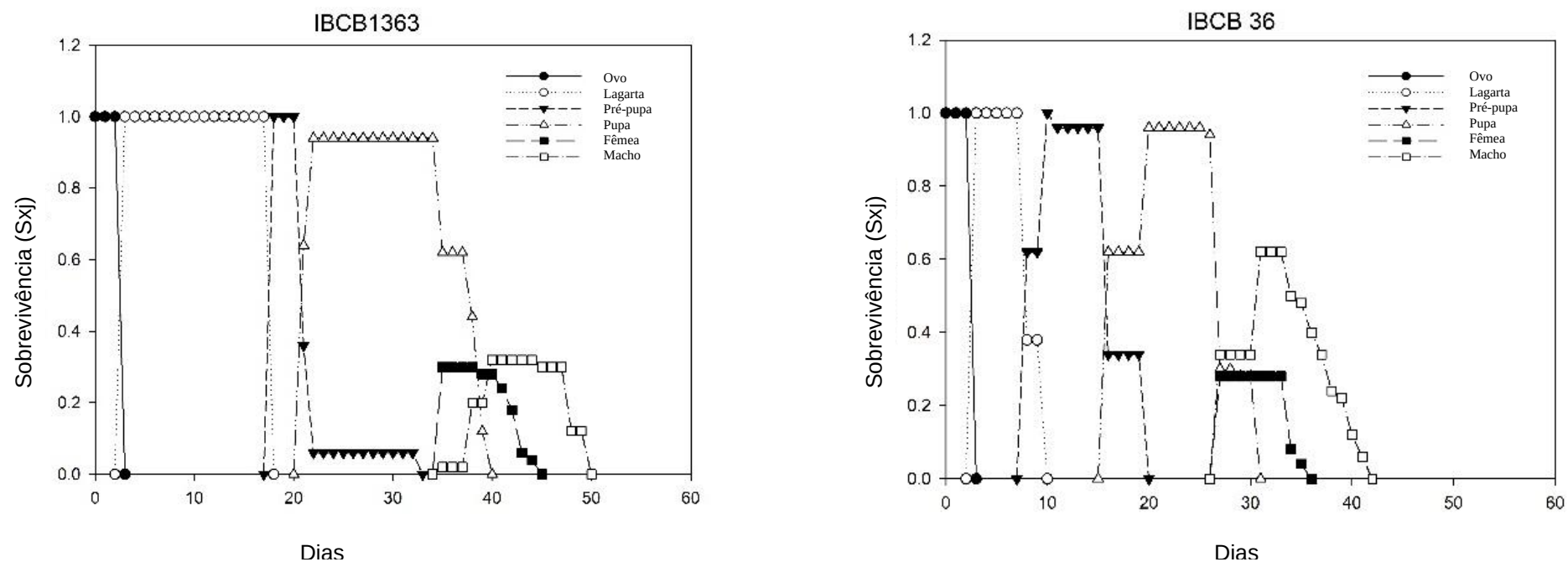


Figura 3. Sobrevivência (sxj) específica dos estágio de vida de *H. armigera* expostas as concentrações subletais de diferentes isolados f de *B. bassiana*.

3.6 Razão sexual e peso das lagartas e pupas

3.6.1 Impacto do fungo *B. bassiana* nos parâmetros biológicos de *H. armigera*

O peso das lagartas após dez dias a exposição aos tratamentos foi reduzido em comparação a testemunha e entre os tratamentos. Para o peso de pré-pupa e pupa apenas o isolado IBCB 1363 afetou o peso e tamanho, com consequentes pupas anormais e adultos defeituosos (Figura 4). A razão sexual não foi afetada por nenhum dos tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Razão sexual, número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, peso das lagartas, peso de pré-pupa (g) e peso de pupa (g) de *H. armigera* tratados com *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

<i>B. bassiana</i>					
Tratamentos	Razão sexual	Viabilidade de ovos (%)	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
ARSEF 1149	0,55	95,87± 0,95 a	0,10 ± 0,01 b	0,36 ± 0,01 a	0,31 ± 0,00 a
ESALQ 1288	0,52	92,23± 0,86 a	0,09 ± 0,01 b	0,36 ± 0,01 a	0,30 ± 0,00 a
IBCB 36	0,50	95,16± 0,98 a	0,07 ± 0,00 b	0,31 ± 0,01 a	0,32 ± 0,01 a
IBCB 170	0,41	83,09± 0,78 b	0,09 ± 0,01 b	0,36 ± 0,01 a	0,33 ± 0,00 a
IBCB 1363	0,40	75,24± 0,72 c	0,07 ± 0,00 b	0,21 ± 0,01 b	0,20 ± 0,01 b
Testemunha	0,50	96,36± 0,65 a	0,26 ± 0,01 a	0,33 ± 0,02 a	0,32 ± 0,01 a
<i>M. anisopliae</i>					
IBCB 425	0,50	60,14± 0,69 c	0,07 ± 0,01 bc	0,31± 0,02 a	0,32± 0,01 a
ESALQ 860	0,43	86,83± 0,41 b	0,08 ± 0,01 bd	0,22 ± 0,01 b	0,24 ± 0,01 b
ESALQ 1051	0,41	93,56± 0,58 a	0,09 ± 0,00 bd	0,22± 0,02 b	0,25± 0,01 b
Testemunha	0,50	97,39± 0,65 a	0,21 ± 0,01 a	0,36 ± 0,01 a	0,35 ± 0,00 a

Médias (± Erro Padrão) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3.6.2 Impacto do fungo *M. anisopliae* nos parâmetros biológicos de *H. armigera*

Em todos os tratamentos o peso das lagartas após dez dias de aplicação dos tratamentos reduziu quando comparados a testemunha. O peso da fase de pré-pupa e pupa apenas os isolados ESALQ 860 e ESALQ 1051 diferiram da testemunha, mas são similares. O isolado IBCB 425 não diferiu da testemunha, mas diferiu dos outros isolados testados. A razão sexual e efeito dos tratamentos não apresentou significância (Tabela 5).



Figura 4. Anormalidades morfológicas em *Helicoverpa armigera* tratada com concentração CL₅₀ do fungo *B. bassiana* (isolado IBCB1363). (A) Interferência no desenvolvimento das lagartas, mostrada pela diferença de tamanho, (B) Antecipação na fase de pupa, diminuição do peso e tamanho das pupas, (C e D) Deformação pupal e adultos

3.7 Tabela de vida

O tempo médio de geração (T) de *H. armigera* para *B. bassiana* indica diferença estatística apenas para os isolados ARSEF 1149 (40,03 dias) e ESALQ 1288 (51,07 dias) em relação a testemunha (41,29 dias). A taxa líquida de reprodução (R₀) para testemunha foi de (216,58) com aumento de 2,5% em relação aos tratamentos (Tabela 6).

A taxa intrínseca de aumento (r) para testemunha (0,130 dia⁻¹) foi significativamente maior em quatro dos cinco isolados, apenas o isolado IBCB 36 não apresentou diferença em relação a testemunha. A taxa finita de aumento (λ), não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos. A taxa bruta de reprodução (GRR) de *H. armigera* para a testemunha (248,61) foi superior a todos os isolados testados ARSEF 1149 (97,34); ESALQ 1288 (87,05); IBCB 36 (78,39); IBCB 1363 (146,44); IBCB 1363 (148,94) apresentando uma diferença significativa entre as fêmeas de todos os tratamentos (Tabela 6).

Todos os isolados do fungo *M. anisopliae* afetaram o tempo médio de geração (T) com aumento significativo em relação a testemunha. A taxa líquida de reprodução (R_0) foi reduzida pelos tratamentos, apresentando diferença entre os tratamentos e a testemunha. A taxa intrínseca de aumento (r) para a testemunha foi maior (0,130) quando comparados aos tratamentos, porém a taxa finita de aumento (λ), não apresentou diferença em nenhum dos isolados testados. A taxa bruta de reprodução (GRR) da testemunha (248,61) foi maior do que a dos tratamentos, IBCB 425 (205,23); ESALQ 860 (136,45) e ESALQ 1051 (113,35) (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros médios ($\pm$ SE) da tabela de vida de *Helicoverpa armigera* submetidos a diferentes isolados dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* ao longo de uma geração a 25 ± 1 ° C. $70 \pm 10\%$ RH.

Parâmetros populacionais					
Tratamentos	<i>Beauveria bassiana</i>				
	T (dia)	R_0	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
ARSEF 1149	40.03 $\pm$ 0.15 b	97.34 $\pm$ 15.88 b	0.114 $\pm$ 0.004 b	1.12 $\pm$ 0.004 a	97.34 $\pm$ 15.88 c
ESALQ 1288	51.07 $\pm$ 0.32 a	83.12 $\pm$ 16.41 c	0.086 $\pm$ 0.004 c	1.09 $\pm$ 0.004 a	87.05 $\pm$ 18.01 d
IBCB 36	31.93 $\pm$ 0.11 c	70.14 $\pm$ 17.24 d	0.133 $\pm$ 0.008 a	1.14 $\pm$ 0.009 a	78.39 $\pm$ 19.01 e
IBCB 170	42.76 $\pm$ 0.14 b	63.58 $\pm$ 19.39 e	0.097 $\pm$ 0.007 c	1.10 $\pm$ 0.008 a	146.44 $\pm$ 38.82 b
IBCB 1363	40.15 $\pm$ 0.24 b	98.48 $\pm$ 24.85 b	0.114 $\pm$ 0.006 b	1.12 $\pm$ 0.007 a	148.94 $\pm$ 36.55 b
TESTEMUNHA	41.29 $\pm$ 0.16 b	216.58 $\pm$ 35.01 a	0.130 $\pm$ 0.004 a	1.11 $\pm$ 0.004 a	248.61 $\pm$ 44.39 a
Tratamentos	<i>Metarhizium anisopliae</i>				
	T (dia)	R_0	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
IBCB 425	43.63 $\pm$ 0.28 c	172.84 $\pm$ 34.50 b	0.118 $\pm$ 0.004 b	1.13 $\pm$ 0.005 a	205.23 $\pm$ 42.71 b
ESALQ 860	51.05 $\pm$ 0.28 b	127.24 $\pm$ 22.23 c	0.094 $\pm$ 0.003 c	1.09 $\pm$ 0.004 a	136.45 $\pm$ 25.41 c
ESALQ 1051	61.05 $\pm$ 0.33 a	92.48 $\pm$ 21.09 d	0.074 $\pm$ 0.004 d	1.07 $\pm$ 0.004 a	113.35 $\pm$ 26.16 d
TESTEMUNHA	41.29 $\pm$ 0.16 c	216.58 $\pm$ 35.01 a	0.130 $\pm$ 0.004 a	1.11 $\pm$ 0.004 a	248.61 $\pm$ 44.39 a

Os dados para cada parâmetro foram calculados usando o procedimento de inicialização de 100.000 cores. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre se (teste de inicialização emparelhado: $P < 0,05$). Duração média de uma geração (dia). R_0 taxa líquida de reprodução. Taxa intrínseca de aumento r (dia⁻¹), λ taxa finita de aumento (dia⁻¹).

4- DISCUSSÃO

O número de isolados altamente virulentos contra *H. armigera* foi maior para o fungo *B. bassiana*, corroborando com os resultados de Hassani (2000), que ao testar a virulência do fungo *B. bassiana* contra as lagartas de *H. armigera* e *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833), concluiu que vários isolados são altamente virulentos contra noctuídeos.

Os isolados podem apresentar características intrínsecas, que estar relacionadas a virulência. Uma dessas características é a produção de enzimas extracelulares, dependendo do isolado, a produção das enzimas pode ser em diferentes níveis, havendo também variações na produção temporal (St. Leger et al., 1986; Sosa-Gómez, 1990; Wang et al., 2009).

A manutenção dessa virulência além dos níveis de produção das enzimas pode estar ligada também a diversidade genética desses fungos que deve ser influenciada pelo habitat em que cada isolado foi obtido (Mora et al., 2016). Pesquisas comparando o local e método de isolamento apontam que aqueles isolados provenientes do solo apresentaram uma mortalidade maior para as lagartas de *H. armigera* (Kalvnadi et al., 2018). De fato, a virulência foi superior no presente estudo quando as lagartas foram expostas aos isolados provenientes do solo. Como exemplo, o isolado *B. bassiana* IBCB 1363 proveniente de solo de seringueira. Entretanto, nos isolados de *M. anisopliae* não foi possível notar essa interferência de habitat.

A alta suscetibilidade das lagartas de *H. armigera* aos isolados de *B. bassiana* foi semelhante à de Nguyen et al., (2007) e Kalvnadi et al., (2018). Entretanto, em relação ao período de desenvolvimento larval, os resultados diferiram dos dados apresentados por Nguyen et al., (2007). Essa variação pode estar relacionada a origem dos isolados testados e ao custo fisiológico de relações imunes para cada população de inseto, ou seja, a existência das barreiras geografias proporciona formações de populações distintas que apresentam custo adaptativo diferente quando submetidas aos mesmos patógenos (Serebrov et al., 2006). Consequentemente, as estratégias para evitar ou superar as ações desses patógenos são diferentes, cada população de hospedeiro evolui e emite respostas imunes distintas (Lu et al., 2016).

O desempenho da progênie de indivíduos sobreviventes aos tratamentos foi afetado adversamente. O aumento do período de desenvolvimento larval ou a redução desse período, foram relatados para outros lepidópteros quando expostos ao fungo *B. bassiana*, como para *Helicoverpa zea* (Boddie 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), que teve o período de desenvolvimento prolongado (Leckie et al., 2008; Malarvannan et al., 2010; Tadele e Pringle 2003; Terefe et al., 2012).

A duração do período de pupa foi prolongada nos isolados *M. anisopliae*, assemelhando-se com os resultados encontrado por Jarrahi e Safavi (2016). Para os isolados de *B. bassiana*, apenas um isolado (IBCB170) prorrogou a duração pupal assemelhando-se com os resultados encontrados por Nguyen et al., (2007). Essas variações de resultados podem estar relacionadas justamente à suscetibilidade e defesa imunológica do inseto alvo (Qu e Wang, 2018; Kalvnadi et al., 2018).

Observou-se um declínio na longevidade das fêmeas para os isolados de *B. bassiana*, consistente com os resultados de Wuroger et al., (2014), e um aumento da longevidade para os isolados de *M. anisopliae*, diferindo dos resultados encontrados por Jarrahi e Safavi (2016). A sobrevivência diminuiu consideravelmente no estágio de pupa, ou seja, as lagartas sobreviventes chegaram até a fase de pupa, na qual ocorreu uma diminuição de peso e a malformações morfológicas das pupas levando a morte (Figura 4). Essas deformações morfológicas, podem ser explicadas pelo sistema de defesa dos insetos, que é composto por barreiras estruturais e por respostas ativas contra elementos estranhos que alcançam a hemocèle como os fungos entomopatogênicos (Ratcliffe et al., 1985; Renwranztz, 1986).

Os fungos agem via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados a outros grupos de patógenos, que só atuam no inseto por via oral. Essa ação de contato é realizada por secreção de uma série de compostos, incluindo bassianin, bassiacridin, oosporeinas, ciclosporina e destruxinas (Gibson et al., 2014; Molnar et al., 2010; Wang et al., 2010), que são responsáveis pela especificidade do hospedeiro e poderiam suprimir a resposta imune dos mesmos (Amiri-Besheli et al., 2000).

O tegumento do inseto e o trato digestivo são barreiras que, ao serem rompidas desencadeiam uma variedade de mecanismos celulares e hormonais

resultando em resposta imunológica (Snodgrass, 1935; Chapman, 1998; Leger et al., 1991; Levy et al., 2004). Durante essas respostas, os insetos começam a perder lipídeos e proteínas que são essenciais para completar o ciclo (Qu e Wang, 2018), justificando a perda de peso nas pupas e a não emergência dos adultos, observadas no presente estudo.

As anormalidades morfológicas presente no estudo já foram relatadas por Kaur et al. (2011) em *Spodoptera litura* e por Prasad e Veerwal, (2012) em *Anopheles stephensi*, Liston, 1901 (Diptera: Culicidae), utilizando fungos entomopatogênicos. A formação das pupas envolve o processo de ecdise que é fundamental para a sobrevivências dos insetos, eliminando a cutícula antes dos fungos romperem as camadas para completar o ciclo. Porém esse processo pode estar fortemente ligado aos nutrientes obtidos na fase de lagartas para formação das novas cutículas (Kaur et al., 2011) e por hormônios como os ecdisteróides e o hormônio juvenil (Lemaitre e Hoffmann, 2007).

A maioria das lagartas tratadas com os isolados de *B. bassiana*, foram incapazes de completar a fase, acarretando o prolongamento do estágio larval e formação de pupas antecipadamente (Figura 4). Tal fato pode ser explicado pelas ações das enzimas bem como a ação do sistema imunológico dos insetos ter acelerado o processo de muda, reduzindo a produção de hormônio juvenil e mantendo a produção de ecdisona, o que induziu o processo de ecdise (Qu e Wang, 2018). As concentrações desses hormônios na hemolinfa determinam tanto a metamorfose completa, quanto o processo reprodutivo dos insetos, o que pode explicar também a diminuição da fecundidade dos adultos tratados com os isolados em comparação a testemunha (Rohlf e Churchill, 2011).

Ao contrário dos resultados de Jarrahi e Safavi (2016) e Arthurs e Thomas (2000) os períodos de pré-oviposição de adultos e o período total de oviposição foram prolongados em *H. armigera* para *M. anisopliae*. A viabilidade dos ovos das fêmeas tratadas com isolados foi menor, coincidindo com os estudos de Kalvnadi et al., (2018) e Blanford e Thomas (2001), porém deferiu dos resultados de Arthurs e Thomas (2000) que não observaram nenhuma redução na fecundidade dos adultos tratados com *M. anisopliae*. Não foi observada efeito sobre a razão sexual em nenhum dos isolados testados (Tabela 5).

B. bassiana e *M. anisopliae* afetaram os parâmetros biológicos T, Ro, r, λ e GRR em *H. armigera*, porém com uma intensidade menor comparado a

testemunha, dependendo do isolado. A taxa líquida de reprodução (R_0) foram significativamente menores do que a do controle, promovendo efeitos que comprometerão a próxima geração, atuando de forma efetiva no controle da espécie.

5- Conclusão

Os isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* resultam em efeito adverso na biologia dos insetos, quando expostos a concentração subletal. Essas interferências foram traduzidas para custos adaptativo, sobrevivência e reprodução, causando a diminuição dos parâmetros da tabela de vida. Assim, os fungos apresentam um alto potencial de controle para *H. armigera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, SB (1998) **Controle microbiano**. FEALQ, Piracicaba, São Paulo, 1163p.

Amiri-besheli B, Khambay B, Cameron S, Deadman ML, Butt TM. (2000) Inter and intra specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium spp.*, and its significance to pathogenesis. **Mycological Research** 104:447-452.

Arthurs S, Thomas MB. (2000) Effects of a mycoinsecticide on feeding and fecundity of the Brown locust *Locustana pardalina*. **Biocontrol Science Technology** 10:321-329.

Ávila JC, Vivian LM, Tomquelski GV. (2013) Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. **Circular Técnica**, 23)

Botelho RZ, Alves PAB, Colonhez PA, Zucchi RMI, Delalibera JI (2019). *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. **Fungal Ecology** 41:289-300.

Butt TM, Brownbridge M (1997) **Fungal pathogens of thrips**. In: Lewis, T., Thripsascopests (ed) CAB International 106p.

Challa MM, Sanivada SK, Koduru UD (2013) Total soluble protein profiles of *Beauveria bassiana* and their relationship with virulence against *Helicoverpa armigera*. **Biocontrol Science and Technology** 23:1169–1185.

Chi H. (1988) Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rate among individuals. **Journal Environ Entomol** 17:26–34

Chi H (2016) TWSEX-MSChart: a computer program for the age-stage, two-sex life table analysis. http://140.120.197.173/Ecology/Download/Twos_ex-MSChart.zip acessado 10 setembro 2019.

Chi H, Liu H. (1985) Two new method for the study of insect population ecology. **Bulletin** 24: 225–240

Chi H, Su HY. (2006) Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female Fecundity and the net reproductive rate. **Zoology Academia Sinica** 35:10–21.

Devi VS, Sharma HC, Rao PA. (2011) Interaction between host plant resistance and biological activity of *Bacillus thuringiensis* in managing the pod borer *Helicoverpa armigera* in chickpea. **Crop Protection** 30:962-969.

Gibson DM, Donzelli BG, Krasnoff SB, Keyhani NO. (2014) Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports** 31:1287-1305.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA. (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial diet. **Journal of Economic Entomology** 69:497-488.

Goettel MS, Eilenberg J, Glare T. (2010) Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Laurence IG, Sarjeet SG (Eds). Insect control: **Biological and synthetic Agents** 113:206-2014.

Hari NS, Mahal MS (2008) Sub-lethal influences of different insecticides on oviposition preference of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton in relation to altered plant morphology. **International Journal of Pest Management** 54:181-187.

Hassani M. (2000) Development and proving of biocontrol methods based on *Bacillus thuringiensis* and entomopathogenic fungi against the cotton pests *Spodoptera lituralis*, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). 130f. **TESE**. University of Giessen, Germany.

Jarrahi A, Safavi SA. (2016) Fitness costs to *Helicoverpa armigera* after exposure to sub-lethal concentrations of *Metarhizium anisopliae* sensu lato: Study on F1 generation. **Journal of Invertebrate Pathology** 138:50-56.

Jaronski ST. (2007) Soil esology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: Ekesi S, Maniania NK Use of Entomopathogenic Fungi in Biological. **Pest Management** 1: 91-144

Kalvnadi E, Mirmoayed A, Alizadeh M, Pourian HR (2018) Sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* increase fitness costs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) offspring. **Journal of Invertebrate Pathology** 158: 32-42.

Kulkarni a S, Ghormade V, Kulkarni G, Kapoor M, Chavan BS, Rajendran A, Pati KS, Shouche Y, Deshpande VM. (2008) Comparison of *Metarhizium* isolates for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea. **Biocontrol Science and Technology** 18:809-828.

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.

Lacey AW. (2017) **Microbial Contril insect and Mite Peste**. FNP: Academic Press, 446p.

Leckie MB, Ownley HB, Pereira MR, Klingeman EW, Jones JC, Gwinn DK. (2008) Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology** 18:697-710.

Lemaitre B, Hoffmann J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology** 25:697- 743.

Leora Software, polo-pc (1987) a user's guide to Probit Or LOgit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.

Levy SM, Falleiros AMF, Gregório EA, Arrebola NR, Toledo LA (2004) The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology** 64: 633-638.

Lu, H.-L., & St. Leger, R. J. (2016). Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. **Advances in Genetics** 94:251–285.

Malarvannan S, Murali PD, Shanthakumar SP, Prabavathy RV, Nair S. (2010) Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the Tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera). **Journal of Biopesticides** 3:12-131.

Molnar I, Gibson DM, Krasnoff SB. (2010) Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. **Natural Product Reports** 27:1241-1275.

Mora MAE, Rouws CRJ, Fraga EM. (2016) Occurrence of entomopathogenic fungi in Atlantic forest soils. **Microbiology Descubray** 4:2052-6180.

Nguyen NTH, Borgemeister C, Poehling MH, 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

Qu S, Wang S. (2018) Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental e Comparative Immunology** 83:96–103.

Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgeald SW, Rhodes CP. (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology** 97:183-279.

Renwranz L. (1986) **Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence origin and roles in immunity**. In: Lackie, AM (Ed). Immunity mechanisms in invertebrate vectors 150p.

Serebrov VV, Gerber NO, Malyarchuk AA, Martemyanov VV, Alekseev AA, Glupov VV. (2006) Effect of entomopathogenic fungi on detoxification enzyme activity in greater waxmoth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) and role of detoxification enzymes in development of insect resistance to entomopathogenic fungi. **Biology Bulletin** 33:581–586.

Tadele T, Pringle KL. (2003) Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* e conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 84:90–95.

Tay WT, Soria FM, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Behere TG, Anderson C. (2013) A brave new world for an old-world pest: *Helicoverpa armigera*

(Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One** 8:134-138.

Terefe HT, Selvaraj T, Mengistu L, Negery M. (2012) Evaluation of some native entomopathogenic fungi against pink stem borer (*Sesamia calamistis* Hampson) (Lepidoptera: Noctuidae) in sugarcane. **Journal of Agricultural Technology** 8:515-536.

Wang D, Qiu X, Ren X, Niu F, Wang, K (2009) Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 95: 90–94.

Wang Z, Wilhelmsson C, Hyrsi P, Loof TG, Dobes P, Klupp M, Loseva O, Morgelin M, Ikle J, Cripps RM, Herwald H, Theopold U. (2010) Pathogen entrapment by transglutaminase-a conserved early innate immune mechanism. **PLoS Pathog** 6:1-10.

Zimmermann G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and technology** 17:879-920.

Zenker MM, Specht A, Corseuil E (2007) Estágios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira Zoologia** 24:99-107.

CAPÍTULO 3- SUSCEPTIBILIDADE DE *Helicoverpa armigera* (Hubner) A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM CONDIÇÃO DE CAMPO NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill): UM ESTUDO DE PERSISTÊNCIA

RESUMO- A soja *Glycine max*. (L.) é uma das principais culturas agrícola do mundo, e o Brasil é o segundo maior produtor. Apesar dos resultados expressivos, a cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos-pragas da germinação à colheita. Dentre as pragas da soja destaca-se a *Helicoverpa armigera*. As lagartas dessa espécie ataca a cultura desde a emergência das plantas. Alternativas de controle estão em expansão, uma delas é o uso de fungos entomopatogênicos que são considerados um método eficiente e seguro. Entretanto, os fungos são muito sensíveis a temperatura, apresentando uma baixa persistência a campo. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a persistência dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em soja, e avaliar a mortalidade e efeito subletal sobre *Helicoverpa armigera*. Os experimentos foram conduzidos nas safras 2018/2019 e 2019/2020. Os bioensaios foram conduzidos em uma área de 0,17 ha⁻¹, em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas. As parcelas foram compostas por um isolado de cada fungo, *B. bassiana* e *M. anisopliae*. As subparcelas por oito períodos de coleta. No momento da pulverização as caldas apresentavam uma concentração 10⁸ conídios.mL⁻¹. Após a pulverização dos tratamentos foram coletadas folhas em oito tempos após a aplicação e levadas ao laboratório. Em cada horário de coleta dos discos foi anotada a temperatura local. Para a avaliação de persistência, foi preparada uma suspensão fúngica com os discos foliares acondicionados em tubos de Falcon contendo 10 mL de água destilada mais 0,001 µl de Tween 80®. Em seguida foi retirada 150 µL e vertida em placa do tipo Rodac. Após 72 horas de inoculação foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para o teste de mortalidade os discos foram colocados individualmente em potes para bioensaios e em cada pote foi colocada uma lagarta do segundo instar de *H. armigera*. As lagartas sobreviventes em cada horário foi avaliado os efeitos subletais. Os resultados mostraram que o fungo *B. bassiana* foi infectivo durante as oito horas de avaliação, sendo mais persistente do que o *M. anisopliae* que no primeiro ano persistiu por três horas e no segundo ano com temperaturas mais amenas durou cinco horas. A porcentagem da mortalidade de *H. armigera* diminuiu com o aumento das horas de aplicação, sendo que nas três primeiras horas ocorreu maior mortalidade para os dois fungos. As avaliações dos efeitos subletais mostraram que há uma correlação inversa entre as UFCs e os parâmetros como fecundidade e peso, observou-se que o maior número de UFCs menores são os pesos e fecundidade.

Palavras-chave: Muscardine branca, Muscardine verde, virulência, efeitos subletais, controle microbiano.

CHAPTER 3- SUSCEPTIBILITY OF *Helicoverpa armigera* (Hubner) TO ENTOMOPATOGENIC FUNGI IN FIELD CONDITIONS IN SOYBEAN CULTURE (*Glycine max* (L.) Merrill): A STUDY OF PERSISTENCE

ABSTRACT- *Glycine max*. (L.) is one of the main agricultural crops in the world, and Brazil is the second largest producer. Despite the expressive results, the soybean crop is subject to attack by insect pests from germination to harvest. Among soybean pests, *Helicoverpa armigera* stands out. Caterpillars of this species attack the crop since the emergence of plants. Control alternatives are expanding, one of which is the use of entomopathogenic fungi that are considered an efficient and safe method. However, fungi are very sensitive to temperature, showing low persistence in the field. In this context, the objective of the work was to evaluate the persistence of fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* in soybeans, and to evaluate mortality and sublethal effect on *Helicoverpa armigera*. The experiments were carried out in the 2018/2019 and 2019/2020 harvests. The bioassays were conducted in an area of 0.17 ha⁻¹, in a completely randomized design with subdivided plots. The plots were composed of one isolate from each fungus, *B. bassiana* and *M. anisopliae*. Subplots for eight collection periods. At the time of spraying, the mixtures had a concentration of 10⁸ conidia.mL⁻¹. After spraying treatments, leaves were collected eight times after application and taken to the laboratory. At each time the discs were collected, the local temperature was recorded. For the assessment of persistence, a fungal suspension was prepared with leaf discs stored in Falcon tubes containing 10 mL of distilled water plus 0.001 µl of Tween 80®. Then 150 µL was removed and poured into a Rodac plate. After 72 hours of inoculation, the counting of the Colony Forming Units (UFC) was performed. For the mortality test, the disks were placed individually in pots for bioassays and in each pot a caterpillar of the second instar of *H. armigera* was placed. The surviving caterpillars at each hour were evaluated for sublethal effects. The results showed that the fungus *B. bassiana* was infectious during the eight hours of evaluation, being more persistent than *M. anisopliae* which in the first year persisted for three hours and in the second year with milder temperatures lasted five hours. The percentage of mortality of *H. armigera* decreased with the increase in the hours of application, and in the first three hours there was a higher mortality for both fungi. The evaluations of sublethal effects showed that there is an inverse correlation between CFUs and parameters such as fertility and weight, it was observed that the largest number of smaller CFUs are weights and fertility.

Keywords: White Muscardine, Green Muscardine, virulence, sublethal effects, microbial control

1- INTRODUÇÃO

A soja *Glycine max.* (L.) é uma das principais culturas agrícola do mundo, e o Brasil é o segundo maior produtor do grão. Na safra de 2017/2018, as exportações da soja no Brasil cresceram 36,2% em relação à safra anterior, e o país exportou 83,6 milhões de toneladas (Conab, 2019).

Apesar dos resultados expressivos, a cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos- pragas da germinação à colheita, onerando o custo de produção pela ocorrência dos danos que esses insetos causam. Dentre as pragas da soja destaca-se a *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidóptero: Noctuideo) , os danos causados por essa espécie ocorrem desde a emergência da planta, quando as lagartas seccionam as plantas sob os cotilédones e a partir do estágio V3 da cultura as lagartas se comportam como desfolhadora e ataca o broto terminal (Suzana et al., 2018).

Em sistemas de cultivo intensivo, como é o caso da maioria das lavouras de soja no Brasil, o controle dessa praga é realizado frequentemente com inseticidas químicos (Ahmad et al., 2003). O uso intensivo desses produtos de amplo espectro de ação tem acelerado o desenvolvimento de resistência dos insetos pragas e reduzido a população de inimigos naturais, tornando-se uma grande preocupação ambiental (Patil et. al., 2006; Wu, 2007). A busca por medidas alternativas que visam diminuir esses impactos são importantes, gentes de controle microbiano são considerados uma alternativa eficiente e segura, especialmente o uso de fungos entomopatogênicos (Sosa-Gómez, 2012).

A ocorrência natural dos fungos entomopatogênicos foi um fator importante por muitos anos nos cultivos de soja onde causava significativa redução das populações de pragas, entretanto o uso abusivo de fungicidas causou redução da sua ocorrência (Sosa-Gómez et al., 2010). Apesar de serem fungos de espécies distintas, a efetividade desses microrganismos despertou interesse e atualmente, patógenos da ordem Hypocreales têm se mostrado efetivo na forma de controle inundativo (Silva et al., 2005; Valicente, 2009; Lacey et al., 2015) e muitas empresas nacionais e multinacionais têm apostado na fabricação de produtos que tenham como ingrediente ativo fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch)

Sorok. Entretanto, a baixa persistência dos bioinseticidas a campo (Glare et al., 2012; Mascarin, 2010; Lacey et al., 2015), têm feito com que esses entomopatogênicos tenha pouca credibilidade perante os produtores.

As lagartas desfolhadoras, entra em contato com os conídios dos fungos quando movimentam-se sobre as folhas. No entanto, os fungos entomopatogênicos apresentam a desvantagem de serem muito suscetíveis a radiação solar, altas temperaturas e baixa umidade (Guerra, 2009; Martins, 2004; Rojas, 2015), fatores esses que podem alterar a eficácia do fungo em campo. Apesar de apresentarem alto potencial de controle (Sosa-Gómez, 2010), pouco se sabe o comportamento desses patógenos a campo, como a persistência desses em folhas de determinada cultura. Dessa forma, estudos que avaliem o potencial de controle desses patógenos em um ecossistema específico são essenciais. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a persistência dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em soja, e avaliar a mortalidade e efeito subletal sobre *Helicoverpa armigera*.

2- MATERIAIS e MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas safras 2018/2019 e 2019/2020 na área experimental do Departamento de Fitossanidade e no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP), na “Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), - Jaboticabal, São Paulo.

2.1 Obtenção e criação de *Helicoverpa armigera*

A população de *H. armigera*, proveniente da empresa Ouro fino Agrociência, São Paulo, Brasil, foi estabelecida no LCMAP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP-FCAV, São Paulo, Brasil.

As lagartas foram criadas individualmente em recipiente plástico transparente (50 mL) contendo aproximadamente 50g de dieta artificial (Greene et al., 1976), até a fase de pupa. As pupas foram mantidas em recipientes plásticos (11,5 de diâmetro e 3,5 cm de altura) com papel filtro, até a emergência dos adultos (machos e fêmeas), sendo transferidos para gaiolas de PVC (20 cm de diâmetro e 30 cm de altura), na face superior das gaiolas foi vedada com tecido voil, na face inferior foi apoiada em prato de plástico (28 cm de diâmetro) recoberto com papel filtro. Internamente a gaiola foi forrada com papel toalha como substrato para oviposição e os insetos adultos foram alimentados com algodão embebidos com solução de mel à 10%.

Os ovos foram coletados das gaiolas a cada três dias e transferidas inicialmente para um recipiente plástico transparente (500 mL), contendo aproximadamente 50 g de dieta artificial, as lagartas foram individualizadas, após dez dias quando atingiam o terceiro ínstar. A criação foi mantida em sala climatizada sobre as condições de temperatura de 25 °C, umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12 horas.

2.2 Seleção de isolados

Para escolha do isolado a ser levado a campo foi realizado bioensaios de virulência de vinte e três isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, proveniente da Collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF)-USDA, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” -(ESALQ, Piracicaba/SP) e do Instituto Biológico de Campinas (IBCB, Campinas- SP).

As suspensões de cada isolado utilizado nos bioensaios foram preparadas

a partir da raspagem dos conídios produzidos em meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar e 1.000 mL de água), e 0,002 µl de Tween 80®.

Após o preparo, cada suspensão fúngica passou por diluições seriadas, para a contagem de conídios utilizando o método de contagem na câmara de Neubauer (Alves e Moraes, 1998), obedecendo um padrão de concentração de 10^8 conídios. mL⁻¹ para cada tratamento. Foram utilizadas lagartas do 2º ínstar de *H. armigera* provenientes da criação estoque do LCMAP. Os ensaios foram constituídos de 23 tratamentos, sendo 10 isolados de *M. anisopliae*, 13 de *B. bassiana* e 1 controle. Para cada tratamento foram individualizadas 200 lagartas, em recipientes de polietileno (18 mm x 30 mm) foi acondicionado dieta artificial (Greene et al., 1976) e em seguida com o auxílio de uma pipeta de 10 µl foi pipetado 0,2 µl do inóculo sobre as lagartas.

Na testemunha o mesmo procedimento foi realizado, substituindo-se a suspensão fúngica por água destilada mais 0,02 (v/v) de Tween 80®. Os recipientes plásticos com os insetos foram fechados e mantidos em sala climatizada. As avaliações foram feitas a partir de três dias após a inoculação, registrando-se o número de insetos mortos total no final de sete dias, as lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao serem tocadas por um pincel de cerdas macias.

Para confirmação da mortalidade pelo patógeno, os insetos foram lavados em álcool 70% por 10 segundos e enxaguados em água destilada por 20 segundos para descontaminação externa, em seguida, acondicionados em placas de Petri com câmara úmida por 15 dias, tornando possível a visualização da extrusão e reprodução do patógeno (confirmação da morte), ou não. Os isolados que apresentaram mortalidade confirmada superior a 80% até o sétimo dia de avaliação foram selecionados para etapa posterior do estudo.

2.3 Aplicação em campo

O bioensaios foram conduzidos em uma área de 0,17 ha⁻¹, em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas. As parcelas (0,056 há⁻¹ cada) foram compostas por um isolado de cada fungo IBCB- 1363 de *B. bassiana*, IBCB- 425 de *M. anisopliae* e 0,003 µl de Tween 80®, mais o controle com água, sendo cada fungo considerado um tratamento. As

subparcelas por oito períodos de coleta (tempo após aplicação). As aplicações foram realizadas as 7:00 horas, com o auxílio de um pulverizador costal, com vazão de 70 L. ha⁻¹, durante 15 segundos por linha. No momento da pulverização as caldas apresentavam uma concentração 10⁸ conídios.mL⁻¹, determinada com o auxílio da câmara de Neubauer, em microscópio com contraste de fase com 400x de aumento (Carl zeiss- Axio LabA1). As caldas foram preparadas instantes antes da aplicação, a testemunha foi aplicado água destilada mais o espalhante.

2.4 Coleta e manuseio dos discos de folhas

Após a pulverização dos tratamentos foram coletadas folíolos da soja NS 7901IPR, em oito tempos (30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 horas após a aplicação) e levadas ao laboratório, os folíolos foram cortadas em discos (3 cm de ø), retirando-se 55 discos por tratamento/avaliação (50 discos para teste de mortalidade e cinco discos para o teste de persistência,), totalizando 400 repetição para cada avaliação (mortalidade e persistência). Em cada horário de coleta dos discos foi anotada a temperatura local, com auxílio de um medidor de temperatura. Na estação meteorológica da Unesp, coletou-se a umidade relativa nos dois anos (safra 2018/2019 e 2019/2020), obtendo-se a média de 72 ±10%. Não ocorreu chuva em nenhum momento de avaliação para os dois anos.

2.5 Avaliação da persistência

Para a avaliação de persistência, foi preparada suspensões fúngica com os discos foliares acondicionados em tubos de Falcon (15 mL) contendo 10 mL de água destilada mais 0,001 µl de Tween 80® (Sosa- Gómez, 2001). Em seguida foi retirada 150 µL e vertida em placa do tipo Rodac® (“Replicate Organism Detection and Counting”), com 3 mL o meio de cultura BDA, revertido na face milimetrada da placa, em superfície plana na câmara de fluxo, as placas foram seladas com Parafilm M® e incubado a 26 ± 1 ° C em um fotoperíodo de 12 h. Cada placa foi considerada uma repetição, no total de 10 placas para cada tempo (30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 horas).

Após 72 horas de inoculação foi realizada a contagem direta das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A contagem foi realizada com auxílio de microscópio ótico (ZEISS AX 10®) e um contador manual, obedecendo a

contagem padrão de placas (contar o número de Unidade Formadora de Colônias da placa e multiplicando pela diluição correspondente).

Para o teste de mortalidade os discos foram colocados individualmente em potes para bioensaios (18 mm x 30 mm), a superfície dos potes foram revertidas por uma mistura gelificada de ágar-água 2,5% com papel filtro, com o objetivo de manter a turgescência das folhas durante o período de avaliação da mortalidade das lagartas. Em cada pote foi colocada uma lagarta do segundo instar de *H. armigera*, totalizando 350 lagartas por tratamento. O bioensaio foram mantidos sob condições controladas (UR: 75 % $\pm$ 12 e T: 25 °C $\pm$ 2). As avaliações de mortalidade foram realizadas após sete dias da inoculação. A lagarta foi considerada morta quando não apresentaram movimentos ao serem tocadas com pincel de cerdas finas.

2.6 Efeito subletal em *Helicoverpa armigera*

As lagartas sobreviventes a exposição fúngica nos discos foliares foram monitoradas diariamente em cada tratamento (horário de coleta). Foram avaliados os parâmetros de duração dos instares (dias), fecundidade, viabilidade de ovos (%), peso de lagartas (mg), peso de pupas (mg), razão sexual e longevidade de adultos (macho e fêmea).

Para verificar a interferência sobre os pesos das lagartas e pupas foi feita a pesagem em uma balança analítica (SHIMADZU-ATY224®) de todas as lagartas do 10º dia, pré-pupa e pupas. A sexagem das pupas foi realizada com auxílio de uma lupa (ZEIZZ-STEMI 508®), separando-se os machos das fêmeas estabelecendo a formação dos casais para avaliar o período pré-oviposição (APOP: período entre o surgimento do adulto e a primeira oviposição), pré-oviposição total (TPOP: período do ovo à primeira reprodução). Os casais formados foram mantidos nas mesmas condições descritas para criação. Oviposição e a longevidade dos adultos foram registrados diariamente.

Para análise das variáveis biológicas de *H. armigera* e confecção da tabela de vida os dados brutos do tempo de desenvolvimento, sobrevivência, fecundidade diária, longevidade de macho e fêmea foram analisadas com base na tabela de vida. Nestas avaliações foram considerados todos os indivíduos testados incluindo os que morreram durante o desenvolvimento do estágio imaturo (Chi e Liu, 1985; Chi, 1988).

Parâmetros de taxa intrínseca de crescimento populacional (r), taxa finita de aumento populacional, (λ), taxa líquida de reprodução, (R_0), duração média de uma geração (T) e a taxa bruta de reprodução (GRR) foram estimados utilizando a metodologia de Chi; Liu (1985).

2.7 Análise dos dados

Para avaliação da mortalidade foi realizada a análise de variância (ANOVA) no programa SAS (University, 2002) em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com os tratamentos em arranjo fatorial e quando significativa as medias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para avaliar a relação entre a mortalidade com o número de unidades formadoras de colônia foram determinados os coeficientes de Correlação de Pearson pelo programa Software estatístico R (R Core Team, 2017).

Os efeitos subletais utilizou-se o procedimento de bootstrap, utilizado para estimar as variações, médias e erro padrão dos parâmetros biológicos do tempo de desenvolvimento, fecundidade e longevidade (CHI, 2019), utilizando 100.000 bootstraps. A comparação dos parâmetros populacionais de *H. armigera* que receberam os tratamentos fúngicos e controle foi feita com o Paired Bootstrap Test ($p < 0,05$) com base no intervalo de confiança de diferença (IC = 95%) (Efron e Tibshirani, 1993; Polat Akko et al., 2015) usando o programa TWOSEX-MS-Chart (CHI, 2016).

3- Resultados

3.1 Sobrevivência dos fungos em relação a temperatura

As UFCs diminuíram ao longo do tempo após a aplicação e aumento de temperatura, apresentando uma correlação significativa inversa (r) -0,8 para o isolado de *B. bassiana* e (r) -0,75 para o isolado de *M. anisopliae*, ou seja, com o aumento de temperatura houve diminuição do UFCs (Figura 1). No segundo ano os fungos se comportaram de maneira similar (r) -0,98 para *B. bassiana* e -0,91 para *M. anisopliae*.

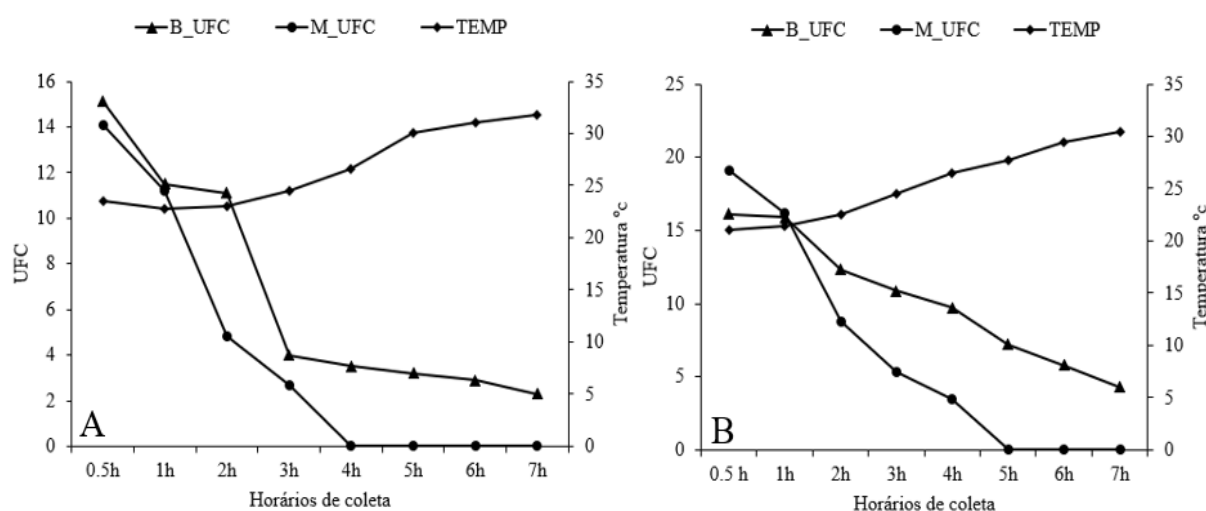


Figura 1. Número de UFCs em função da temperatura no horário de coleta após aplicação. Unidade formadora de colônia (UFC); UFC de *B. bassiana* (B_UFC); UFC de *M. anisopliae* (M_UFC). Primeiro ano de avaliação (Figura A), segundo ano de avaliação (Figura B).

3.2 Efeito do tempo após a aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na mortalidade de *H. armigera*

Observa-se na Tabela 1 que no fator fungos e horário de coleta ocorreu significância ($p < 0,01$) para a mortalidade no primeiro e segundo ano de avaliação.

Tabela 1. Síntese da análise de variância para a mortalidade no primeiro e segundo ano.

Fontes de Variação	Valores de F	
	Mortalidade 1 ^a ano (%)	Mortalidade 2 ^a ano. (%)
Fungos (F)	529,38**	239,98**
Tempo após aplicação (TC)	25,49**	34,37**
F*TC	12,32**	13,39**
CV%	80,74**	102,65**

** : significativo(p<0.01); CV%: coeficiente de variação.

Foram checados se os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variância. Verificou-se que ocorreu interação a 1% de probabilidade e a mortalidade em ambos os anos, sendo os resultados dessa interação apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Interação entre os fatores fungos e horário de coleta, para variável porcentagem (%) de mortalidade ($\pm$) erro padrão da média no primeiro (2018/2019) e segundo ano (2019/2020).

MORTALIDADE PRIMEIRO ANO (%)			
Tempo após aplicação	Tratamentos		
	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Controle
0.5h	86 $\pm$ 0,04 aAB	78 $\pm$ 0,05 aA	6 $\pm$ 0,03 bA
1h	94 $\pm$ 0,02 aA	66 $\pm$ 0,06 bA	4 $\pm$ 0,02 cA
2h	82 $\pm$ 0,05 aABC	64 $\pm$ 0,06 bA	2 $\pm$ 0,02cA
3h	78 $\pm$ 0,05 aABC	68 $\pm$ 0,06 aA	0 $\pm$ 0,00 bA
4h	82 $\pm$ 0,05 aABC	20 $\pm$ 0,05 bB	2 $\pm$ 0,02cA
5h	74 $\pm$ 0,06 aABC	18 $\pm$ 0,05 bB	6 $\pm$ 0,03 bA
6h	66 $\pm$ 0,06 aBC	6 $\pm$ 0,03 bB	2 $\pm$ 0,02 bA
7h	62 $\pm$ 0,06 aC	4 $\pm$ 0,02 bB	0 $\pm$ 0,00 bA
MORTALIDADE SEGUNDO ANO (%)			
Tempo após aplicação	Tratamentos		
	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Controle
0.5h	66 $\pm$ 0,06 aAB	62 $\pm$ 0,06 aB	14 $\pm$ 0,04 bA
1h	74 $\pm$ 0,06 aAB	90 $\pm$ 0,04 aA	8 $\pm$ 0,03 bA
2h	82 $\pm$ 0,05 aA	68 $\pm$ 0,06 aAB	2 $\pm$ 0,02 bA
3h	76 $\pm$ 0,06 aAB	56 $\pm$ 0,07 bB	0 $\pm$ 0,00 cA
4h	70 $\pm$ 0,06 aAB	24 $\pm$ 0,06 bC	8 $\pm$ 0,03 bA
5h	58 $\pm$ 0,07 aBC	4 $\pm$ 0,02 bCD	10 $\pm$ 0,04 bA
6h	40 $\pm$ 0,06 aCD	0 $\pm$ 0,00 bD	6 $\pm$ 0,03 bA
7h	30 $\pm$ 0,06 aD	0 $\pm$ 0,00 bD	0 $\pm$ 0,00 bA

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas primeiras horas após a aplicação, o isolado do fungo *B. bassiana* causou alta mortalidade, variando de 86% a 62% para o primeiro ano e de 82% a 30% no segundo ano, observou-se que no segundo ano houve uma queda no percentual de mortalidade nas últimas horas de coleta (Tabela 2). Enquanto o isolado do fungo *M.anisopliae*, apresentou um comportamento distinto, no primeiro ano de aplicação o fungo permaneceu na folha apenas três horas após a aplicação, causando mortalidade apenas nas primeiras horas 78% a 4% e no segundo ano com temperaturas mais amenas aumentou para cinco horas (Figura 1), após aplicação, com percentual de mortalidade variando de 90 % a 24% (Tabela 2).

O comportamento das UFCs e a mortalidade, foi verificado pela ocorrência na redução da mortalidade à medida que reduz as UFCs, sendo a correlação (r) 0,76 para o isolado de *B. bassiana* e (r) 0,82 para o isolado de *M. anisopliae*, no primeiro ano e de (r) 0,78 e 0,87 respectivamente, para o segundo (Figura 2).

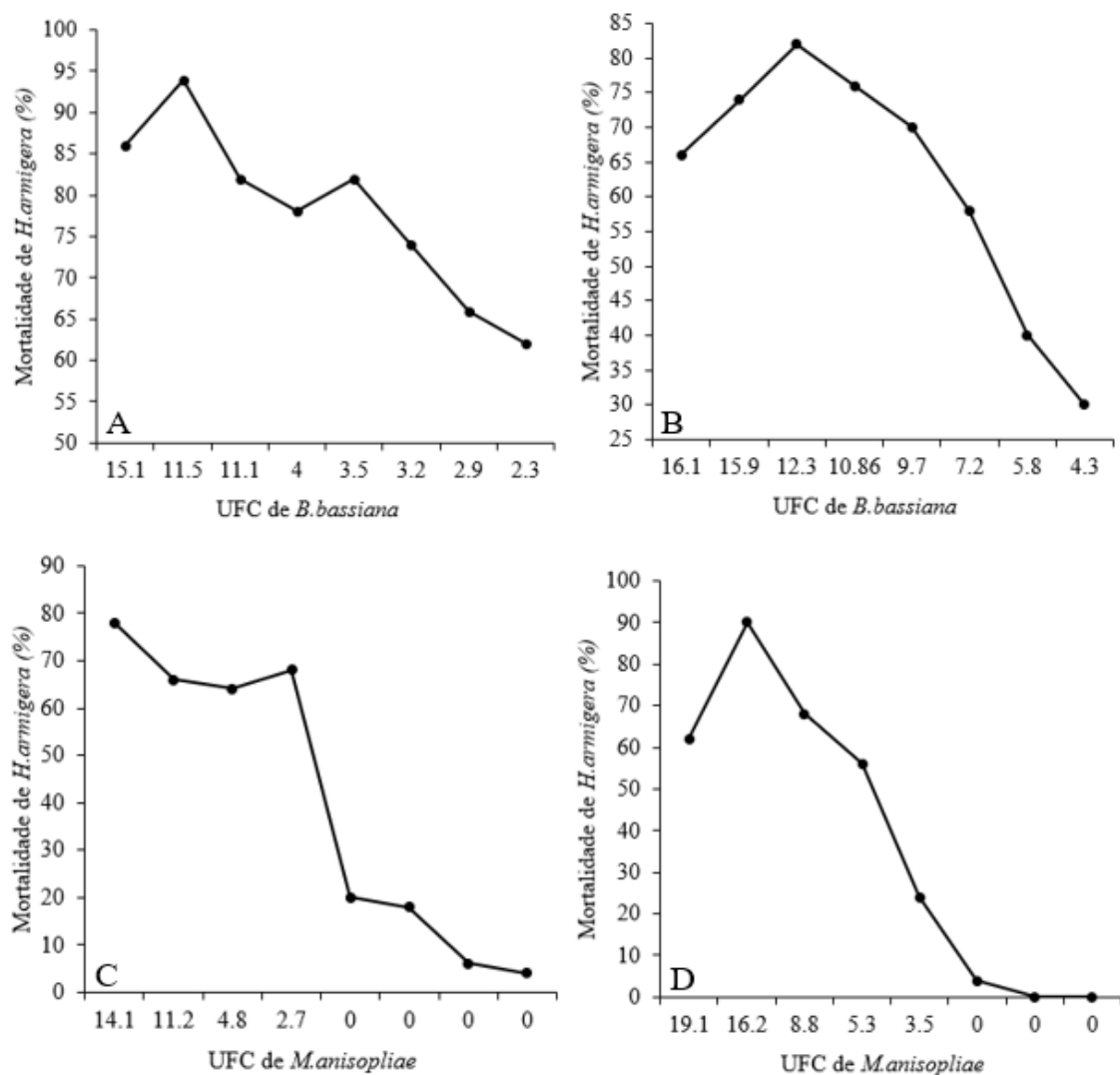


Figura 2. Gráfico de correlação entre o número de UFCs dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e a mortalidade de *H. armigera*. Figura A e B primeiro e segundo ano de avaliação para *B. bassiana* e Figura C e D primeiro e segundo ano de avaliação para o fungo *M. anisopliae*.

2.3 Efeito subletal

Na testemunha para o peso de lagarta no 10º dia e peso de pupa não foi observado significância ($p < 0,05$), enquanto no peso da pré-pupa houve diferença sendo os maiores valores de pesos observados a partir de quatro horas após a aplicação. Para o isolado do fungo *B. bassiana* a diferença ocorreu apenas no peso das lagartas do 10º dia, nos horários de uma hora e três horas após a aplicação. Enquanto para o isolado do fungo *M. anisopliae* a diferença apresentou somente para o peso de pupas tendo os maiores valores a partir de quatro horas (Tabela 3).

Tabela 3. Peso das lagartas sobreviventes em relação ao horário de coleta do primeiro ano

Testemunha			
Horário de coleta	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
0.5 h	0.04 ± 0.01 Ns	0.20 ± 0.03 c	0.33 ± 0.02 Ns
1 h	0.06 ± 0.01	0.28 ± 0.03 abc	0.31 ± 0.02
2 h	0.05 ± 0.00	0.22 ± 0.02 bc	0.31 ± 0.01
3 h	0.07 ± 0.00	0.22 ± 0.02 bc	0.31 ± 0.01
4 h	0.05 ± 0.00	0.37 ± 0.02 a	0.34 ± 0.01
5 h	0.04 ± 0.00	0.37 ± 0.02 a	0.34 ± 0.01
6 h	0.05 ± 0.01	0.34 ± 0.02 ab	0.33 ± 0.01
7 h	0.05 ± 0.01	0.40 ± 0.04 a	0.33 ± 0.01
<i>B. bassiana</i>			
Horário de coleta	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
0.5 h	0.03 ± 0.00 b	0.36 ± 0.06 Ns	0.30 ± 0.01
1 h	0.08 ± 0.03 a	0.22 ± 0.05	0.34 ± 0.03
2 h	0.03 ± 0.01 b	0.26 ± 0.03	0.31 ± 0.01
3 h	0.03 ± 0.00 a	0.28 ± 0.03	0.35 ± 0.02
4 h	0.04 ± 0.00 ab	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.02
5 h	0.05 ± 0.00 ab	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.01
6 h	0.03 ± 0.01 b	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.01
7 h	0.03 ± 0.00 b	0.26 ± 0.03	0.36 ± 0.01
<i>M. anisopliae</i>			
Horário de coleta	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
0.5 h	0.03 ± 0.00 Ns	0.30 ± 0.04 Ns	0.29 ± 0.01 ab
1 h	0.03 ± 0.00	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.00 bc
2 h	0.07 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.00 ab
3 h	0.07 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.27 ± 0.00 c
4 h	0.05 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.34 ± 0.01 a
5 h	0.05 ± 0.00	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01 a
6 h	0.05 ± 0.00	0.36 ± 0.02	0.31 ± 0.01 ab
7 h	0.05 ± 0.0	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.01 ab

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Ns- Não significativo

Observa-se na Tabela 4, que para o segundo ano, que não houve significância ($p < 0,05$), em nenhum tratamento.

Tabela 4. Peso das lagartas sobreviventes em relação ao horário de coleta do segundo ano

Testemunha			
Horário de coleta	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
0.5 h	0.04 ± 0.00 Ns	0.27 ± 0.03 Ns	0.32 ± 0.01 Ns
1 h	0.04 ± 0.00	0.24 ± 0.03	0.31 ± 0.02
2 h	0.05 ± 0.02	0.38 ± 0.07	0.29 ± 0.02
3 h	0.03 ± 0.00	0.26 ± 0.04	0.34 ± 0.02
4 h	0.05 ± 0.00	0.27 ± 0.04	0.29 ± 0.01
5 h	0.04 ± 0.00	0.29 ± 0.04	0.35 ± 0.03
6 h	0.05 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.03
7 h	0.05 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.33 ± 0.01

<i>B. bassiana</i>			
Horário de coleta	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
0.5 h	0.04 ± 0.00 Ns	0.34 ± 0.04 Ns	0.34 ± 0.01 Ns
1 h	0.03 ± 0.00	0.35 ± 0.12	0.33 ± 0.03
2 h	0.01 ± 0.02	0.32 ± 0.08	0.35 ± 0.01
3 h	0.05 ± 0.00	0.34 ± 0.03	0.30 ± 0.00
4 h	0.06 ± 0.00	0.28 ± 0.11	0.32 ± 0.02
5 h	0.02 ± 0.00	0.31 ± 0.06	0.35 ± 0.02
6 h	0.02 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.02
7 h	0.05 ± 0.01	0.25 ± 0.05	0.36 ± 0.01

<i>M. anisopliae</i>			
Horário de coleta	Peso 10º dia	Peso pré-pupa	Peso pupa
0.5 h	0.02 ± 0.00 ab	0.26 ± 0.03 Ns	0.35 ± 0.15 Ns
1 h	0.01 ± 0.00 b	0.37 ± 0.05	0.33 ± 0.00
2 h	0.02 ± 0.00 ab	0.23 ± 0.06	0.33 ± 0.02
3 h	0.03 ± 0.00 a	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.01
4 h	0.02 ± 0.00 ab	0.33 ± 0.07	0.37 ± 0.01
5 h	0.03 ± 0.00 a	0.40 ± 0.03	0.32 ± 0.01
6 h	0.02 ± 0.00 ab	0.36 ± 0.04	0.29 ± 0.01
7 h	0.02 ± 0.00 ab	0.33 ± 0.08	0.37 ± 0.01

Médias seguidas das mesmas letras minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Ns- Não significativo

3.4 Influência das UFCs nos efeitos subletais

Nota-se na Figura 4 (A) que o grau de associação entre as variáveis UFC de *B. bassiana*, peso de lagartas, peso de pré-pupa e peso de pupa, apresentam uma correlação fraca, já na Figura 3 (B), a variável UFC de *B. bassiana* correlacionada com peso de lagarta e peso de pupa apresentou uma correlação inversa forte a muito forte, ou seja, quanto maior as UFCs menor o valor do peso da lagarta e pupa, enquanto as demais correlações foram desprezíveis.

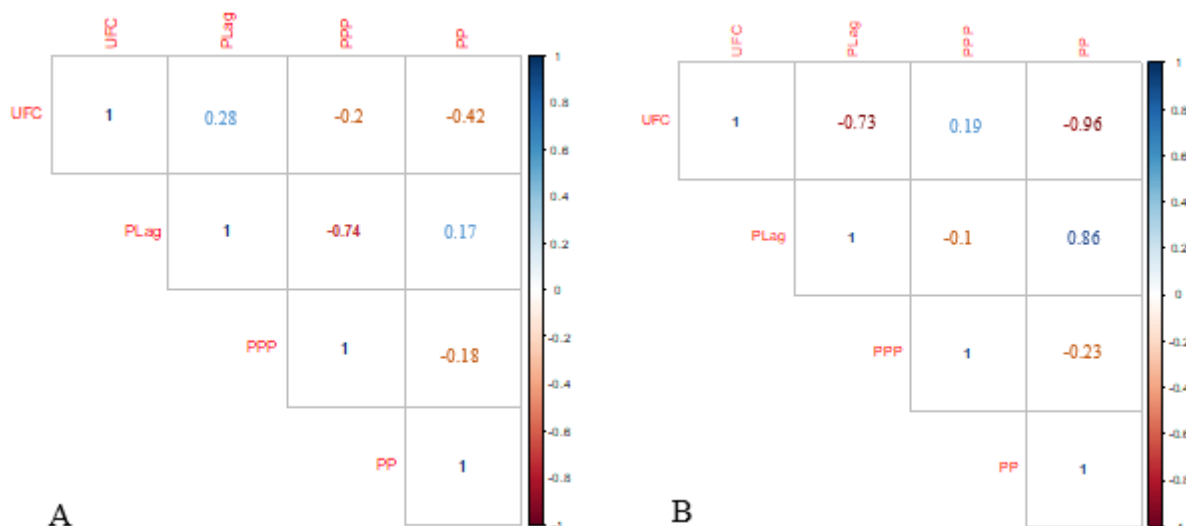


Figura 3. Gráfico de correlação das UFCs de *B. bassiana* e a variável peso das lagartas, pré-pupa e pupa de *H. armigera*, primeiro ano (A) e segundo ano (B). NOTA: Unidade Formadora de colônia (UFC); Peso de lagartas (PLag); Peso de pré-pupa (PPP); Peso de pupa (PP).

O grau entre as variáveis peso de lagartas, peso de pré-pupa, pupa e as UFCs do fungo *M. anisopliae*, apresentaram uma correlação forte inversa para com a variável UFC e peso de lagartas, na medida que aumenta a UFC diminui o peso das lagartas (Figura 4A). Observou-se que no segundo ano, a variável UFC obteve uma correlação forte com as variáveis peso de lagarta e pré-pupa, e uma correlação moderada para peso de pupa (Figura 4B).

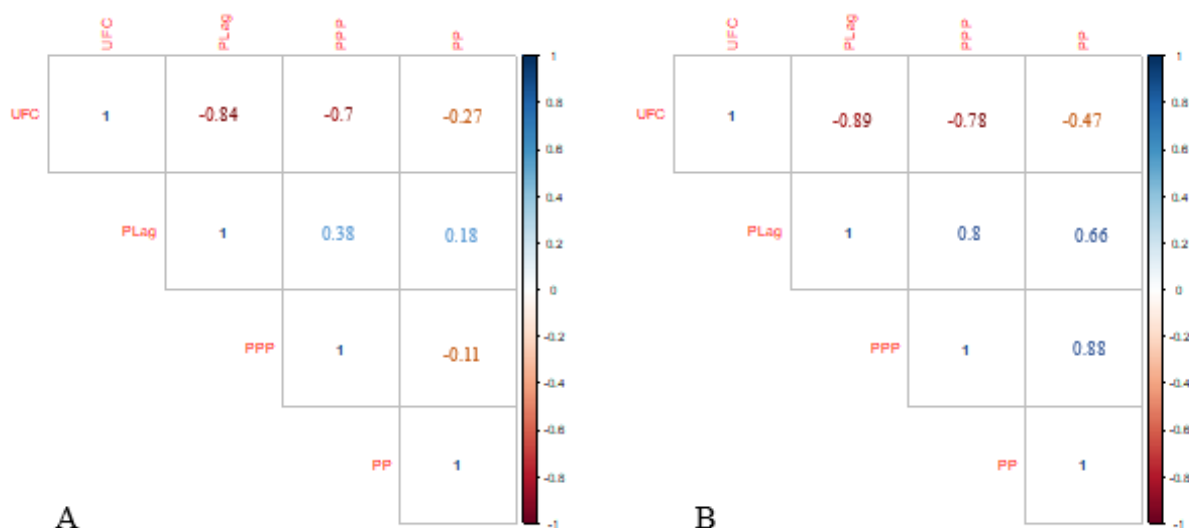


Figura 4. Gráfico de correlação das UFCs de *M. anisopliae* e a variável peso das lagartas, pré-pupa e pupa de *H. armigera*, primeiro ano (A) e segundo ano (B). NOTA: Unidade Formadora de colônia (UFC); Peso de lagartas (PLag); Peso de pré-pupa (PPP); Peso de pupa (PP).

3.5 Tabela de vida

Não houve diferença significativa para o tempo médio de geração (T) do

isolado de *B. bassiana* em nenhum horário de coleta. A taxa líquida de reprodução (R_0) foi menor na primeira hora de coleta (0,5 horas) apresentando um aumento de 9,4 % em relação aos horários finais. A taxa intrínseca de aumento (r) foi significativamente maior em quatro das oito horas após aplicação, apenas no horário de 0,5 horas e 1 horas apresentou diferença. A taxa finita de aumento (λ), apresentou diferença nas três primeira horas tendo um aumento de 1,14% após quatro horas aplicação. A taxa bruta de reprodução (GRR) de *H. armigera* para seis horas (296,14) foi superior as demais horas de avaliação (Tabela 5).

O isolado de *M. anisopliae* para o tempo médio de gerações (T) houve diferença estatística apenas para a primeira hora de coleta (0,5 hora). A taxa líquida de reprodução (R_0) apresentou diferença em todos os horários de avaliação tendo a maior média na hora sete de (237,1). A taxa intrínseca de aumento (r) foi significativamente menor na primeira hora (0,5 hora) tendo um aumento de 88% até o fim da coleta (7 horas). A taxa finita de aumento (λ) não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos. A taxa bruta de reprodução (GRR) de *H. armigera* foi maior (323,32) nas seis horas após a aplicação (Tabela 5).

A testemunha não diferiu significativamente em nenhum horário de avaliação para todos os parâmetros avaliados (Tabela 5). Quando comparou os horários de coleta com tratamentos fúngicos com a testemunha observa-se que para o tempo médio de gerações (T) não houve diferença para *B. bassiana* quanto para *M. anisopliae*. A taxa líquida de reprodução (R_0) de *B. bassiana* em relação a testemunha foi significativamente menor para todos os horários. Já para *M. anisopliae* a partir de quatro horas não diferiu da testemunha. A taxa intrínseca de aumento (r) para os dois fungos só diferiram da testemunha na primeira hora de coleta (0,5 hora). A taxa finita de aumento (λ) não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos em relação a testemunha. A taxa bruta de reprodução (GRR), diferiram significativamente entre os tratamento de *B. bassiana* (296,14) em relação a testemunha (330,41), já para *M. anisopliae* (323,32) não apresentou diferença nos últimos horário de coleta se igualando a testemunha (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros médios ($\pm$ SE) da tabela de vida de *Helicoverpa armigera* submetidos a diferentes horário de coleta após aplicação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em campo na cultura de soja para o primeiro ano (2019) ao longo de uma geração a 25 ± 1 ° C. $70 \pm 10\%$ RH.

Parâmetros populacionais					
Tratamentos	<i>Beauveria bassiana</i>				
	T (dia)	R_0	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
0.5 hora	38.60 $\pm$ 0.44 Ns	12.95 $\pm$ 6.19 e	0.066 $\pm$ 0.013 c	1.106 $\pm$ 0.014 b	187.8 $\pm$ 63.03 d
1 hora	35.46 $\pm$ 0.11	38.79 $\pm$ 11.32 d	0.103 $\pm$ 0.009 b	1.108 $\pm$ 0.009 b	268.7 $\pm$ 50.85 ab
2 horas	37.91 $\pm$ 0.35	81.29 $\pm$ 18.75 b	0.116 $\pm$ 0.006 a	1.123 $\pm$ 0.007 a	269.9 $\pm$ 55.02 ab
3 horas	36.87 $\pm$ 0.53	50.62 $\pm$ 11.04 c	0.106 $\pm$ 0.006 ab	1.112 $\pm$ 0.007 b	210.4 $\pm$ 28.11 c
4 horas	34.94 $\pm$ 0.13	63.7 $\pm$ 10.17 c	0.118 $\pm$ 0.004 a	1.126 $\pm$ 0.005 a	112.93 $\pm$ 15.16
5 horas	34.72 $\pm$ 0.16	137.73 $\pm$ 20.17 a	0.142 $\pm$ 0.005 a	1.152 $\pm$ 0.005 a	245.88 $\pm$ 28.42 b
6 horas	36.29 $\pm$ 0.18	119.74 $\pm$ 18.06 a	0.131 $\pm$ 0.004 a	1.140 $\pm$ 0.004 a	296.14 $\pm$ 56.61 a
7 horas	36.29 $\pm$ 0.2	110.28 $\pm$ 16.60 a	0.129 $\pm$ 0.004 a	1.138 $\pm$ 0.004 a	203.79 $\pm$ 26.09 c
Tratamentos	<i>Metarhizium anisopliae</i>				
	T (dia)	R_0	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
0.5 hora	41.26 $\pm$ 0.58 a	21.78 $\pm$ 7.80 f	0.074 $\pm$ 0.009 c	1.07 $\pm$ 0.001 Ns	211.19 $\pm$ 58.56 c
1 hora	35.90 $\pm$ 0.12 b	163.61 $\pm$ 22.41 c	0.142 $\pm$ 0.004 a	1.15 $\pm$ 0.004	214.48 $\pm$ 26.86 c
2 horas	36.45 $\pm$ 0.32 b	147.27 $\pm$ 18.77 c	0.137 $\pm$ 0.003 a	1.14 $\pm$ 0.004	287.31 $\pm$ 36.3 b
3 horas	36.20 $\pm$ 0.32 b	109.75 $\pm$ 17.31 d	0.129 $\pm$ 0.004 ab	1.13 $\pm$ 0.005	190.36 $\pm$ 34.45 d
4 horas	34.94 $\pm$ 0.13 b	63.7 $\pm$ 10.16 e	0.118 $\pm$ 0.004 b	1.12 $\pm$ 0.005	112.93 $\pm$ 15.13 d
5 horas	34.71 $\pm$ 0.16 b	137.2 $\pm$ 20.15 c	0.141 $\pm$ 0.004 a	1.15 $\pm$ 0.005	244.86 $\pm$ 28.18 bc
6 horas	35.72 $\pm$ 0.1 b	281.0 $\pm$ 24.74 a	0.157 $\pm$ 0.002 a	1.17 $\pm$ 0.002	323.32 $\pm$ 26.82 a
7 horas	33.62 $\pm$ 0.14 b	237.1 $\pm$ 27.88 ab	0.162 $\pm$ 0.003 a	1.17 $\pm$ 0.004	275.54 $\pm$ 31.53 b
Tratamentos	Testemunha				
	T (dia)	R_0	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
0.5 hora	35.65 $\pm$ 0.17 Ns	283.32 $\pm$ 24.00 Ns	0.151 $\pm$ 0.003 Ns	1.16 $\pm$ 0.003 Ns	330.41 $\pm$ 41.47 Ns
1 hora	35.91 $\pm$ 0.11	263.61 $\pm$ 22.45	0.141 $\pm$ 0.004	1.15 $\pm$ 0.004	316.56 $\pm$ 26.48
2 horas	35.59 $\pm$ 0.12	287.93 $\pm$ 21.81	0.147 $\pm$ 0.003	1.58 $\pm$ 0.003	319.82 $\pm$ 23.60
3 horas	35.77 $\pm$ 0.11	278.39 $\pm$ 22.54	0.144 $\pm$ 0.004	1.15 $\pm$ 0.004	319.18 $\pm$ 29.42
4 horas	35.68 $\pm$ 0.12	282.38 $\pm$ 26.83	0.151 $\pm$ 0.004	1.16 $\pm$ 0.004	327.52 $\pm$ 30.44
5 horas	35.72 $\pm$ 0.1	281.02 $\pm$ 24.74	0.150 $\pm$ 0.002	1.17 $\pm$ 0.003	323.32 $\pm$ 26.83
6 horas	33.71 $\pm$ 0.1	281.02 $\pm$ 24.74	0.167 $\pm$ 0.002	1.18 $\pm$ 0.003	323.35 $\pm$ 26.80
7 horas	33.62 $\pm$ 0.14	287.1 $\pm$ 27.87	0.162 $\pm$ 0.003	1.17 $\pm$ 0.004	325.54 $\pm$ 31.50

Os dados para cada parâmetro foram calculados usando o procedimento de inicialização de 100.000 cores. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferi entre se (teste de inicialização emparelhado: $P < 0,05$). Duração média de uma geração (T dia). R_0 taxa líquida de reprodução. Taxa intrínseca de aumento r (dia⁻¹), λ taxa finita de aumento (dia⁻¹). GRR taxa bruta de reprodução. Ns- Não significativo

No segundo ano de avaliação houve diferença estatística para o tempo médio de geração (T) do isolado de *B. bassiana* nas três primeiras horas de coleta. A taxa líquida de reprodução (R_0) foi menor na primeira hora de coleta (0.5 horas) apresentando um aumento de 162,19% após três horas e um declínio nos horários finais (6 e 7 horas). A taxa intrínseca de aumento (r) e a taxa finita de aumento (λ) não apresentaram diferença em nenhum horário de coleta. A taxa bruta de reprodução (GRR) de *H. armigera* para três horas (319,85) foi superior as demais horas de avaliação (Tabela 6).

M. anisopliae para o tempo médio de gerações (T) houve diferença estatística apenas para a primeira e terceira hora de coleta (0,5 e 2 hora, respectivamente). A taxa líquida de reprodução (R_0) apresentou diferença em todos os horários de avaliação tendo a maior média de nas amostras coletadas após três horas de aplicação (253,66). A taxa intrínseca de aumento (r) foi significativamente menor na primeira hora (0,5 hora) tendo um aumento de 194,5% até o fim da coleta (7 horas). A taxa finita de aumento (λ) não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos. A taxa bruta de reprodução (GRR) de *H. armigera* foi maior (495,66) nas cinco horas após a aplicação (Tabela 6).

A testemunha não diferiu significativamente em nenhum horário de avaliação para todos os parâmetros avaliados (Tabela 6). Quando se comparou horários de coleta após aplicação dos tratamentos fúngicos e a testemunha observou-se que os resultados consideram com os resultados do primeiro ano de avaliação (Tabela 5).

Tabela 6. Parâmetros médios ($\pm$ SE) da tabela de vida de *Helicoverpa armigera* submetidos a diferentes horário de coleta após aplicação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em campo na cultura de soja para o segundo ano (2020) ao longo de uma geração a 25 ± 1 ° C. $70 \pm 10\%$ RH.

Parâmetros populacionais					
<i>Beauveria bassiana</i>					
Tratamentos	T (dia)	R ₀	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
0.5 hora	36.17 $\pm$ 0.64 b	42.96 $\pm$ 14.96 e	0.103 $\pm$ 0.010 Ns	1.109 $\pm$ 0.011 Ns	268.5 $\pm$ 36.33 b
1 hora	38.41 $\pm$ 0.41 b	81.98 $\pm$ 19.60 b	0.123 $\pm$ 0.006	1.130 $\pm$ 0.007	258.76 $\pm$ 27.81 b
2 horas	39.87 $\pm$ 0.17 b	112.64 $\pm$ 24.36 a	0.118 $\pm$ 0.005	1.125 $\pm$ 0.006	319.85 $\pm$ 28.11 a
3 horas	47.22 $\pm$ 0.33 a	70.97 $\pm$ 18.05 c	0.090 $\pm$ 0.005	1.094 $\pm$ 0.006	267.54 $\pm$ 24.85 b
4 horas	47.22 $\pm$ 0.32 a	70.97 $\pm$ 18.00 c	0.092 $\pm$ 0.005	1.097 $\pm$ 0.005	109.48 $\pm$ 24.83 c
5 horas	47.18 $\pm$ 0.34 a	63.44 $\pm$ 16.07 d	0.087 $\pm$ 0.006	1.091 $\pm$ 0.006	144.77 $\pm$ 28.08 c
6 horas	47.19 $\pm$ 0.35 a	58.61 $\pm$ 14.49 e	0.086 $\pm$ 0.005	1.090 $\pm$ 0.0061	220.92 $\pm$ 15.722 b
7 horas	47.52 $\pm$ 0.38 a	72.14 $\pm$ 18.31 c	0.090 $\pm$ 0.006	1.094 $\pm$ 0.006	271.92 $\pm$ 24.37 b
<i>Metarhizium anisopliae</i>					
Tratamentos	T (dia)	R ₀	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
0.5 hora	41.26 $\pm$ 0.58 a	21.78 $\pm$ 7.80 e	0.074 $\pm$ 0.009 d	1.07 $\pm$ 0.001 Ns	211.19 $\pm$ 58.56 c
1 hora	36.24 $\pm$ 0.65 b	47.26 $\pm$ 17.15 d	0.106 $\pm$ 0.011 c	1.11 $\pm$ 0.012	294.25 $\pm$ 86.97 b
2 horas	47.22 $\pm$ 0.32 a	47.22 $\pm$ 17.99 d	0.090 $\pm$ 0.005 cd	1.09 $\pm$ 0.006	109.48 $\pm$ 24.76 d
3 horas	35.91 $\pm$ 0.26 b	253.66 $\pm$ 39.96 b	0.154 $\pm$ 0.004 b	1.16 $\pm$ 0.005	405.68 $\pm$ 70.24 a
4 horas	35.82 $\pm$ 0.21 b	116.46 $\pm$ 32.49 c	0.132 $\pm$ 0.008 b	1.14 $\pm$ 0.006	159.64 $\pm$ 45.28 cd
5 horas	36.06 $\pm$ 0.22 b	314.2 $\pm$ 45.49 a	0.159 $\pm$ 0.004 b	1.17 $\pm$ 0.004	495.66 $\pm$ 71.87 a
6 horas	37.15 $\pm$ 0.31 b	118.61 $\pm$ 32.47 c	0.218 $\pm$ 0.005 a	1.21 $\pm$ 0.002	320.52 $\pm$ 85.25 b
7 horas	37.22 $\pm$ 0.35 b	152.18 $\pm$ 38.32 c	0.190 $\pm$ 0.006 ab	1.29 $\pm$ 0.006	261.98 $\pm$ 25.38 c
Testemunha					
Tratamentos	T (dia)	R ₀	r (dia ⁻¹)	λ (dia ⁻¹)	GRR
0.5 hora	35.65 $\pm$ 0.17 Ns	283.32 $\pm$ 24.00 b	0.151 $\pm$ 0.003 b	1.16 $\pm$ 0.003 Ns	330.41 $\pm$ 41.47 b
1 hora	35.51 $\pm$ 0.14	388.31 $\pm$ 28.36 a	0.167 $\pm$ 0.002 b	1.18 $\pm$ 0.002	450.17 $\pm$ 49.53 a
2 horas	35.92 $\pm$ 0.23	302.54 $\pm$ 38.27 ab	0.159 $\pm$ 0.003 b	1.17 $\pm$ 0.004	490.56 $\pm$ 63.73 a
3 horas	35.92 $\pm$ 0.23	303.26 $\pm$ 38.27 ab	0.159 $\pm$ 0.003 b	1.12 $\pm$ 0.003	485.33 $\pm$ 37.41 a
4 horas	35.92 $\pm$ 0.26	254 $\pm$ 39.85 b	0.154 $\pm$ 0.004 b	1.16 $\pm$ 0.005	399.62 $\pm$ 69.09 ab
5 horas	37.18 $\pm$ 0.34	63.45 $\pm$ 16.03 d	0.087 $\pm$ 0.005 c	1.09 $\pm$ 0.006	339.77 $\pm$ 21.75 b
6 horas	37.15 $\pm$ 0.31	288.61 $\pm$ 28.52 b	0.316 $\pm$ 0.005 a	1.00 $\pm$ 0.002	326.02 $\pm$ 65.02 b
7 horas	36.72 $\pm$ 0.41	148.12 $\pm$ 25.31 c	0.291 $\pm$ 0.006 a	1.05 $\pm$ 0.006	391.95 $\pm$ 27.32 ab

Os dados para cada parâmetro foram calculados usando o procedimento de inicialização de 100.000 cores. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferi entre se (teste de inicialização emparelhado: $P < 0,05$). Duração média de uma geração (T dia). R₀ taxa líquida de reprodução. Taxa intrínseca de aumento r (dia⁻¹), λ taxa finita de aumento (dia⁻¹). GRR taxa bruta de reprodução. Ns- Não significativo

4- Discussão

Os fungos entomopatogênicos ao serem aplicados sob condições de campo estão sujeitos a ação de fatores bióticos e abióticos, que podem influenciar na sua sobrevivência e infecção no hospedeiro (Goettel e Wraight, 2000). Entre os abióticos, destaca-se a temperatura e a radiação solar que podem afetar a sobrevivência dos fungos a longo prazo em um determinado ambiente, considerando o acesso do hospedeiro suscetível (Alves, 1998; Lacey et al., 2015). A maioria dos microrganismos não possui proteção contra os efeitos deletérios da temperatura, incluindo os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Braga et al., 2001).

Os resultados de nosso estudo indicaram claramente que há variabilidade na susceptibilidade dos isolados fúngicos quando expostos a campo, com perda abrupta de conídios viáveis com aumento da temperatura, tal fato, atuando direta ou indiretamente limita a ação dos fungos, justificando a diminuição da mortalidade após horas de aplicação. A termotolerância dos conídios dos fungos entomopatogênico varia entre isolados e espécies de fungos. Estudos conduzidos por Fernandes et al., (2007) relataram que existe uma alta variabilidade na termotolerância de *Beauveria* spp., após 2 horas de exposição à 45 °C obtendo diferentes índices de germinação (80%-20%). Souza et al., (2014) avaliaram a termotolerância de várias espécies de fungos entomopatogênicos e os resultados mostraram que *M. anisopliae* foi mais sensível a altas temperaturas.

Segundo Engler e Rogoff (1976), a rápida inativação dos entomopatógenos em condições de campo é devida às elevadas temperaturas, irradiação solar e microambientes na superfície das folhas, incluindo pH e os desconhecidos inativadores liberados pelas plantas. Conídios de *B. bassiana* são altamente suscetíveis ao efeito da luz solar (Fargues et al., 1996). A luz solar na faixa de 290 a 400 nm pode afetar a persistência dos fungos depositados nas folhagens (Fuxa, 1987). Ambientes com temperaturas acima de 35 °C reduzem a persistência, apresentando as temperaturas baixas menores efeitos (Mcoy et al., 2006).

A termotolerância a altas temperaturas também foi relacionada à

hidrofobicidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos (Kim et al., 2010), os isolados de *B. bassiana* apresentam quantidades maiores de proteínas hidrofobina, e consequentemente têm maior termotolerância (Ying e Feng, 2004), explicando o motivo pelo qual, nos resultados mesmo ocorrendo variações na temperatura, o fungo *B. bassiana* foi encontrado em todo o período de avaliação. Assim, nos dois anos de estudo, a persistência dos fungos foi maior em temperaturas mais amenas, como 25°C para os fungos em estudo, coincidindo com os resultados de Gardner et al. (1977).

De forma geral, foi observada redução do número de UFCs ao longo das avaliações, reforçando o efeito dos fatores abióticos sobre a persistência dos conídios em condição de campo. Essas variações caracterizadas por aumentos e reduções, no número de UFC, no transcorrer das oito horas de avaliações, refletiu também na susceptibilidade de *H. armigera* pois a virulência do fungo estar ligada a concentração de conídios e sua capacidade de germinar quando entra em contato com a praga. Desta forma, a quantidade inicial e final de conídios distinta reflete na porcentagem de mortalidade do inseto limitando a eficiência desses agentes de controle.

A eficiência de fungo entomopatogênico na produção de uma cultura irá depender da persistência do inóculo em campo. Embora existam exceções, a persistência dos fungos entomopatogênicos em diferentes partes da planta é de poucos dias ou horas. *B. bassiana* permanece viável de 5 a 21 dias na superfície da planta (Gardner et al., 1977; Ignoffo et al., 1979; Ignoffo et al., 1992). Como demonstrado nos nossos resultados que mesmo após oito horas de aplicação ainda foi encontrado conídios viáveis para *B. bassiana*, assim o fungo foi infectivo durante todo o período de avaliação.

Como as lagartas de *H. armigera* têm hábito de caminhar e ovipositar nas folhas, a aplicação do fungo direcionada é estratégia para atingir o inseto. Esse tipo de aplicação também limita a infecção, pois o efeito na planta hospedeira na expressão de doenças epizooticas não é bem conhecido (Sosa- Gómez, 2012). Além das variações de temperatura, a baixa persistência dos fungos ocorrida no presente estudo pode estar relacionada com a composição química e a estrutura física da superfície foliar, que pode influenciar na aquisição do conídio infectivo, afetando a germinação ou inibindo a virulência desses fungos (Inyang, 1999).

Assim como Leite et al., (2011) em nossos estudos o fungo *B. bassiana* foi

mais eficiente em condição de campo quando comparado com o fungo *M. anisopliae*, para o controle de *H. armigera*. Considerando a diminuição das UFCs em concentrações subletais observamos a suscetibilidade das lagartas de *H. armigera* em relação ao período de desenvolvimento dos indivíduos sobreviventes aos tratamentos. Os percentuais de mortalidade permitem inferir que os isolados além de serem infectivo pode alterar o comportamento das lagartas em concentrações baixas de conídios, como a diminuição de tempo de desenvolvimento que foi alterado mesmo horas após a aplicação.

A correlação negativa entre o número de UFC e os pesos é provavelmente parte da resposta imune do inseto, lagartas infectadas com menor número de UFCs tende a ter maiores pesos, pois o sistema fisiológico do inseto induzirá a gastar mais energia para combater a infecção causada pelo patógeno, reduzindo a alimentação (Hajek e St. Leger, 1994). Efeitos inibidores tais como a redução da fecundidade indica sucesso na efetividade do fungo no inseto hospedeiro. Assim, mesmo quando o número de conídios não é o suficiente para causar a morte, pode causar infecção e afetar a prole, tornando um controle efetivo.

A importância de selecionar isolados fúngicos apropriados para bom desempenho em campo em determinadas condições é importante, visto que na literatura está repleta de exemplos de fungos que tiveram bom desempenho em ensaios de laboratório mostrando “grande potencial ” mas podem falhar quando forem testados em campo, e assim levando a busca por isolados novos, sem investigar fatores subjacentes como o métodos de aplicação desses patógenos em campo, que atualmente é escasso e têm sido realizada as mesmas técnicas de pulverização desenvolvidas para produtos químicos (Garcia et al., 2005).

As formulações podem melhorar as características de manuseio e a segurança dos microrganismos, e podem ser adaptadas ao ambiente em que o patógeno será utilizado (Jaronski, 2010). Por exemplo uma formulação em óleo, ou até mesmo a busca por encapsulamento (Lacy et al., 2015). Assim, estratégias para um uso mais eficientes precisam ser melhor investigadas para potencializar os efeitos desses agentes de controle a campo.

5- Conclusões

O fungo *B. bassiana* foi infectivo durante oito horas de avaliação, sendo mais persistente do que o *M. anisopliae* que no primeiro ano persistiu por três horas e no segundo ano com temperaturas mais amenas durou cinco horas.

A porcentagem da mortalidade de *H. armigera* diminuiu com o aumento das horas de aplicação, sendo que nas três primeiras horas ocorreu maior mortalidade de *H. armigera* pelos dois fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alves SB, Pereira RM. (1998) Produção de fungos entomopatogênico. In Alves SB. (ED). **Controle microbiano de insetos**. 342p. Piracicaba: FEALQ, 2.

Braga GUL, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW. (2001) Viability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54°S. **Jornal Invertebrate Pathology** 78:97-108.

Engler R, Rogoff MH. (1976) Entomopathogens: ecological manipulation of natural associations. **Environmental Health Perspectives** 14:153-159.

Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Vidal C, Lacey LA, Lomer CJ, Rougier M. (1996) Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia** 135:171-18.

Fernandes EKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREO, Robert DW. (2007) Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. Isolates. **Journal of Invertebrate Pathology** 96:237-243.

Fuxa JR. (1987) Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Reviews Entomology** 32:225-251.

Garcia LC, Raetano CG, Wilcken SRS, Ramos HH, Leite LG, Filho AB, Moscardi F. (2005) Pressurização da calda de pulverização na viabilidade de microrganismos entomopatogênicos. **Engenharia Agrícola** 25:783-790.

Gardner WA, Sutton RM, Noblet R. (1977) Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. **Environmental Entomology** 6:616-618.

Ignoffo CM, Garcia C, Alyoshina OA, Lappa NV. (1979) Laboratory and field studies with Boverin: a mycoinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. **Journal of Economic Entomology** 72:562-565.

Ignoffo CM. (1992) Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. **Florida Entomologist** 75:516-525.

Jaronski ST. (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl** 55:159-185.

Kim J, Skinner M, Hata T, Parker BL. (2010) Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity

assay. **Journal of Invertebrate Pathology** 105:322-328.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1-41.

Leite PSM, Iede TE, Pendeado CRS, Zaleski MRS, Camargo MMJ, Ribeiro DR. (2011) Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Hedypathes betulinus* e avaliação da persistência. **Floresta** 41:619-628.

Glare TR, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Kohl J, Marrone P, Morin L, Stewart A. (2012) Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology** 30:250-258.

Goettel MS, Inglis GD. Fungi: Hyphomycetes. (2000) In: LANCEY, L.A. (Ed). **Manual of techniques in insect pathology** 5: 213-250.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA. (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial diet, **Journal of Economic Entomology** 69:487-488.

Hajek, AE, St. Leger, RJ. (1994) Interactions between Fungal Pathogens and Insect Hosts. **Annual Review of Entomology** 39:293-322.

Inyang EN, Butt TM, Beckett A, Archer S. (1999) The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research** 103:419-426.

Mascarin GM, Pauli G. (2010) Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. 195p In: Venzon M, Trazilbo JPJ, Pallini A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica**. U.R. EPAMIG ZM. 402p.

Mcoy C, Quintela ED, Faria M. **Environmental persistence of entomopathogenic fungi**. Disponível em: <www.isua.gcenter.com/s265/mcco.htm>. Acesso em: 15/01/2020.

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC. (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo CB, Ferreira BS, Moscardi F. Soja: **Manejo Integrado e Insetos e outros Artrópodes-Praga**. Embrapa 4:213-334.

Patil S, Bashasab F, Vijaykumar, Basavanagoud, Kuruvinashetti MS, Patil BV. (2006) Genetic relatedness among *Helicoverpa armigera* (Hübner) occurring on different host plants as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 9:227-233.

Rojas AMV. (2015) **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosa* quanto à produção de conídios, efeito da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa**. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Entomologia), Piracicaba.

Silva RZ, Neves PMOJ, Santoro PH. (2005) Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. **Semina Ciências Agrárias** 26:305-311.

Sosa-Gómez DR, Delpin KE, Moscardi F, Farias JRB. (2001) Natural Occurrence of the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in Soybean Under Till and No-till Cultivation Systems. **Neotropical Entomology** 30:407-410.

Sosa-Gómez DR, Corrêa-Ferreira BS, Hoffmann-Campo CB, Corso IC, Oliveira LJ, Moscardi F, Panizzi AR, Bueno AF, Hirose E. (2010) **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 90p.Embrapa-CNPSo.

Sosa-Gómez DR. (2012) **Implications of Plant Hosts and Insect Nutrition on Entomopathogenic Diseases**: In: Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management. Embrapa.

Sosa-Gómez DR, Specht A, Moraes PVS, Lopes LA, Yano SAC, Micheli A, Morais GF, Gallo OP, Pereira RVS, Salvadori RJ, Botton M, Zenker MM, Azevedo FWS. (2016) Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** 60:101–104.

Souza RKF, Azevedo RFF, Lobo AO, Rangel DEN. (2014) Conidial water affinity is importante characteristic for thermotolerance in entomopatohogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology** 24:448-461.

Suzana SC, Rosa FC, Alves LF, Salvador RJ. (2018) Consumption and use of soybean by the caterpillar *Helicoverpa armigera*. **Ciência Rural** 48:1-12.

Valicente HF. (2009) Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário** 30:48-55.

Ying SH, Feng MG. (2004) Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoraseus* as fungal biocontrole agentes. **Journal of Applied Microbiology** 97:323-331.

Wu KM. (2007) Regional management strategy for cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in China. **Control of Insect Pests** 7:559-565.

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção de isolados promissores para o controle de uma determinada praga pode fornecer informações valiosas que permitem melhorias no manejo integrado de pragas (MIP). A importância de selecionar o isolados fúngico apropriado mostraram respostas comportamentais distintas, essas variação no nível de respostas dos diferentes isolados justifica a importância do estudo. Como no presente estudo que demonstra de forma significativa a eficiência do fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o controle de *H. armigera*, causando além de alta mortalidade alterações no comportamento biológico da espécie.

A falta de dados de campo, a complexidade do ambiente e as interações de diferentes fatores ambientais e biológico podem confundir as observações em torno de causas e efeitos, observada no estudo. Por exemplo fatores abiótico como radiação solar, umidade, temperatura e a topografia da folha, podem afetam a eficácia e persistência dos tratamentos fúngicos aplicados contra as lagartas de *H. armigera*. É necessário investir mais esforços na avaliação dos efeitos de práticas agrícolas sobre persistência e particularmente eficiência em campo dos fungos entomopatogênicos.

Claramente, precisa desenvolver uma melhor compreensão da complexa interação de fatores como, o tipo de cultura, fisiologia, idade, isolados fúngico, biologia da praga, métodos de aplicação e os inertes para conceber práticas de uso eficientes. Assim, são necessários mais testes em condições de campo para identificar os efeitos de fatores bióticos e abióticos na eficácia e persistência desses agentes de controle.

A presente pesquisa, no entanto, se concentrou em mostra as diferentes respostas para os isolados fúngicos tanto os efeitos letais como subletais, e a importância de selecionar o isolado específico para determinada praga, compreendendo a eficiência do isolado em condições de campo em determinada cultura.