

ANA PAULA DE ALMEIDA PORTELA DA SILVA

**INFECTIVIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* À
ZAPRIONUS INDIANUS (MOSCA-DO-FIGO) SOB
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

RECIFE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**INFECTIVIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* À
ZAPRIONUS INDIANUS (MOSCA-DO-FIGO) SOB
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

RECIFE

2007

ANA PAULA DE ALMEIDA PORTELA DA SILVA

INFECTIVIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* À *ZAPRIONUS INDIANUS* (MOSCA-DO-FIGO) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia de fungos.

MESTRANDA: Ana Paula de Almeida Portela da Silva

ORIENTADORA: Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADOR: José Ferreira dos Santos

RECIFE

2007

Silva, Ana Paula de Almeida Portela da
Infectividade de *Metarhizium anisopliae* à *Zaprionus*
***indianus* (mosca-do-figo) sob condições de laboratório/ Ana**
Paula de Almeida Portela da Silva . – Recife: A Autora, 2007.

50 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – UFPE.
CCB

1. Fungos 2. *Metarhizium anisopliae* 3. *Zaprionus*
***indianus* 4. Micologia I. Título**

582.28

CDU (2^a. Ed.)

UFPE

579

CDD (22^a. Ed.)

CCB – 2007 – 176

ANA PAULA DE ALMEIDA PORTELA DA SILVA

**INFECTIVIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* À *ZAPRIONUS INDIANUS*
(MOSCA-DO-FIGO) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

ORIENTADORA: Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADOR: José Ferreira dos Santos

Dissertação defendida em 13 de fevereiro de 2007.

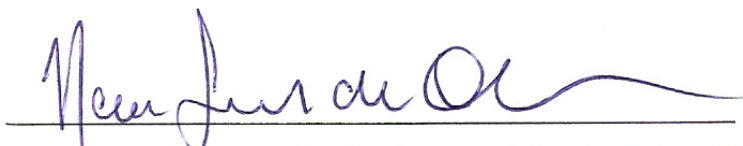
Menção: APROVADA

BANCA EXAMINADORA

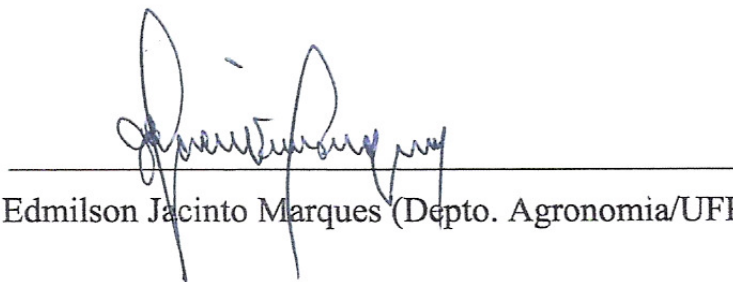
TITULARES:



Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (Depto. Micologia/UFPE)



Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Depto. Micologia/UFPE)



Dr. Edmilson Jacinto Marques (Depto. Agronomia/UFRPE)

SUPLENTES:

Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Depto. Micologia/UFPE)

Dr. Ricardo Yara (Depto. Antibióticos/UFPE)

“As pessoas fazem seus planos,
porém é o Deus Eterno quem dá
a última palavra.” Provérbios
16:1 (BLH)

Ao meu esposo, pais e irmãos, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por mais esta etapa concluída em minha vida, sem Ele eu não conseguiria fazer nada.

Ao meu esposo, José Ivison, pelo amor, paciência, atenção, incentivo e apoio em todo o tempo.

Aos meus pais, Dulce Maria e José Adair, e meus irmãos, Thiago e Lucas, pelo amor, paciência e incentivo em toda a minha vida.

A toda a minha família pela ajuda sempre que precisei.

A minha querida orientadora, profa. Elza, pelo amor, incentivo, instrução, confiança e cumplicidade. Sempre disposta a ouvir, gastar tempo e dar tudo de si pelos seus alunos e pela ciência. Sua bondade, amizade e determinação são exemplos para todos que convivem com ela. Nem sei como agradecer tanta dedicação! Obrigada por tudo!

As minhas amigas do Laboratório de Citologia e Genética (Depto. Micologia), Virgínia e Rosineide, pela amizade, companheirismo e ajuda na execução da parte prática deste trabalho. Nossa amizade durará eternamente!

A todos do Laboratório de Citologia e Genética (Depto. Micologia), Profa. Laura, Mariele, Patrícia, Ana Paula, Daisi, Guaraná, Francisco, Antônio, Emily, Gabriela, Fernanda e Juliana, pelo ambiente amigável de Laboratório.

Aos colegas de turma do mestrado pelo convívio harmonioso. Em especial, a Inaldo Ferreira pela ajuda na obtenção das fotos;

A todos do Laboratório de Controle Biológico e a Profa. Ângela pela ajuda e apoio na realização dos experimentos.

A Profa. Auristela (Depto. Biologia/UFRPE) pelas valiosas sugestões na elaboração dos bioensaios.

Aos professores José Ferreira e Tânia (Depto. Genética) pelo livre acesso no Laboratório de Genética Animal e aos colegas Nara e Sérgio pela ajuda na realização desta pesquisa.

Ao Dr. Venézio (IPA) e ao Dr. Francisco Braga pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os professores e funcionários do Depto. Micologia/CCB/UFPE pela disposição em ajudar, quando necessário.

Aos órgãos públicos de fomento à pesquisa CAPES/CNPQ/BNB.

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

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos Taxonômicos e Biológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	3
2.2 Controle Biológico por Fungos Entomopatogênicos	5
2.3 Controle Biológico por <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
2.4 Patogenicidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> a Dípteros	7
2.5 <i>Zaprionus indianus</i> (Diptera: Drosophilidae) (Mosca-do-Figo).....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Locais de experimentos	15
3.2 Linhagens fúngicas utilizadas	15
3.3 Espécie da mosca utilizada	16
3.4 Meios de cultura utilizados	
3.4.1 Batata-Dextrose-Ágar (BDA) – (OXOID)	16
3.4.2 Dieta para larvas e adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	16
3.5 Soluções Empregadas	16
3.6 Bioensaios	16
3.6.1 Produção de conídios em arroz	17
3.6.2 Quantificação do inóculo	17
3.6.3 Viabilidade de Conídios.....	17
3.6.4 Bioensaio com larvas de <i>Zaprionus indianus</i>	18
3.6.5 Bioensaio com adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	18
3.6.6 Produção de conídios em cadáveres de <i>Zaprionus indianus</i>	18

3.6.7 Reisolamento de linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> a partir de <i>Zaprionus indianus</i>	19
3.7 Aspectos Morfológicos do Reisolado	19
3.7.1 Análise das Microestruturas	19
3.7.2 Diâmetro da Colônia	19
3.8 Análise Estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Bioensaio com larvas de <i>Zaprionus indianus</i>	21
4.2 Bioensaio com adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	26
4.3 Aspectos morfológicos do reisolado	35
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Zaprionus indianus</i> , adaptado (STEIN et al., 2005; VAN DER LINDE, 2005).....	10
Figura 2. Figo sadio (a) e figo infestado por <i>Zaprionus indianus</i> (b- ostíolo, c- polpa)....	11
Figura 3. Ritmo de Emergência de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , a partir de larvas infectadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349, em dias.....	23
Figura 4. Ritmo de Emergência de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , a partir de larvas infectadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403, em dias.....	23
Figura 5. Adulto de <i>Zaprionus indianus</i> colonizado por <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349.....	29
Figura 6. Percentual médio da mortalidade de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> infectados com diferentes concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349.....	32
Figura 7. Percentual médio da mortalidade de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> infectados com diferentes concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403.....	33
Figura 8. Colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 (padrão) (a) e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403 (padrão) (b), após 15 dias de crescimento em BDA, a 28° C.....	37

Figura 9. Apressórios de *Metarhizium anisopliae* URM3349, após 48 horas, em BDA, a 28° C (640X).....37

Figura 10. Conidióforos ramificados de *Metarhizium anisopliae* URM3349 reisolado de *Zaprionus indianus*, após 96 horas, em BDA, a 28° C (640X).....38

Figura 11. Anastomoses de hifas em *Metarhizium anisopliae* URM3349, após 48 horas, em BDA, a 28° C (640X).....38

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Linhagens fúngicas utilizadas.....	15
Tabela 2. Período médio de pré-pupa e estágio pupal de <i>Zaprionus indianus</i> , em dias, a partir de larvas infectadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403.....	22
Tabela 3. Percentual de emergência de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , após 14 dias da exposição das larvas a <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403.....	25
Tabela 4. Percentual da mortalidade acumulada de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , em diferentes dias após a exposição a <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
Tabela 5. Percentual da mortalidade de adultos de <i>Zaprionus indianus</i> , após 12 dias da exposição a <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403.....	27
Tabela 6. Concentração Letal (CL ₅₀) (conídios/mL) de <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403 sobre adultos de <i>Zaprionus indianus</i>	29
Tabela 7. Produção de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403 sobre cadáveres de <i>Zaprionus indianus</i> (x10 ⁷ conídios/mL).....	34
Tabela 8. Diâmetro da colônia (cm) de <i>Metarhizium anisopliae</i> URM3349 e <i>Metarhizium anisopliae</i> URM4403 (padrão e reisolado) de <i>Zaprionus indianus</i>	35

INFECTIVIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* À *ZAPRIONUS INDIANUS* (MOSCA-DO-FIGO) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

ANA PAULA DE ALMEIDA PORTELA DA SILVA

RESUMO

Zaprionus indianus foi introduzida no Brasil de forma acidental, provavelmente pelo comércio mundial de frutas. Devido às condições ambientais favoráveis e a ausência de inimigos naturais, vêm se espalhando por todo o país, infestando figos e frutos nativos, causando prejuízos à fruticultura. Uma alternativa de controle dessa mosca é a utilização de fungos entomopatogênicos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a infectividade de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas e adultos de *Z. indianus*. As larvas foram imersas e os adultos foram pulverizados com suspensões de 10^4 a 10^8 conídios/mL. Foram analisados os parâmetros biológicos: período de pré-pupa, estágio pupal, ritmo de emergência, percentual de emergência e mortalidade de adultos. O período de pré-pupa e o estágio pupal de *Z. indianus* não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle (1,3 e 5,9 dias, respectivamente); o percentual de emergência de adultos foi significativamente reduzido, menor que 3%, na concentração de 10^8 conídios/mL. Após nove dias de infecção, 98% dos adultos morreram, na concentração mais elevada. A CL_{50} foi $1,64 \times 10^5$ conídios/mL e $1,94 \times 10^4$ conídios/mL para *M. anisopliae* URM3349 e URM4403, respectivamente. O TL_{50} foi de quatro a seis dias com 10^8 conídios/mL. *Metarhizium anisopliae* reisolado de *Z. indianus* não apresentou alterações morfológicas, mas o diâmetro da colônia foi maior do que antes da passagem pelo inseto, alcançando 6,76 cm. De acordo com os resultados obtidos, as duas linhagens de *M. anisopliae* testadas apresentaram ação patogênica contra *Z. indianus* indicando assim sua potencialidade para o controle biológico desse inseto.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Zaprionus indianus*, Fungos Entomopatogênicos, Controle Biológico.

INFECTIVITY OF *METARHIZIUM ANISOPLIAE* TO *ZAPRIONUS INDIANUS* (FIG FLY) UNDER LABORATORY CONDITIONS

ANA PAULA DE ALMEIDA PORTELA DA SILVA

ABSTRACT

Zaprionus indianus was introduced in Brazil accidentally, probably through world business of fruits. Environmental favorable conditions and the absence of natural enemies, have been responsible to wide distribution for the whole country, infesting figs and native fruits, causing damages in crop fruits. An alternative of control of this fly could be entomopathogenic fungi. This work had as objective evaluate the infectivity of *Metarhizium anisopliae* on larvae and adults of *Z. indianus*. The larvae were immersed and the adults were pulverized with suspensions of 10^4 to 10^8 conidia/mL. The analyzed biological parameters were: pre-pupa period, pupal stage, rhythm of emergence, percentage of emergence and mortality of adults. The pre-pupa period and the pupal stage of *Z. indianus* did not have significant alterations regarding the group control (1,3 and 5,9 days, respectively); the percentage of adults emergence was significantly reduced, being less than 3%, in the concentration of 10^8 conidia/mL. After nine days of infection, 98% of the adults died, in the most elevated concentration. The LC_{50} was $1,64 \times 10^5$ conidia/mL and $1,94 \times 10^4$ conidia/mL for *M. anisopliae* URM3349 and URM4403, respectively. The LT_{50} was from four to six days with 10^8 conidia/mL. *Metarhizium anisopliae* re-isolated of *Z. indianus* did not show morphological alterations, but the colony diameter was bigger than the fungus standard one, reaching 6.76cm. In accordance to the obtained results, two lineages of *M. anisopliae* tested showed pathogenic action against *Z. indianus* indicating potentiality for biological control of this insect.

Key-words: *Metarhizium anisopliae*, *Zaprionus indianus*, Entomopathogenic Fungi, Biological Control.

1. INTRODUÇÃO

A mosca *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae), supostamente de origem africana, tem se disseminado nas últimas décadas pelos trópicos, possivelmente pelo aumento do comércio mundial de frutas. Na região de origem, esta espécie ainda não foi considerada uma praga, porém após a invasão na América do Sul, parece estar atingindo o *status* de praga, devido às condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e à ausência de inimigos naturais (VILELA, 1999).

O primeiro registro da ocorrência desta mosca no continente Americano foi no Brasil, no Estado de São Paulo, em março de 1999, onde adultos foram observados sobre caquis (*Diospyros kaki*) caídos ao solo, em início de decomposição. No mesmo ano, também em São Paulo, foi encontrada se alimentando e fazendo postura em figos (*Ficus carica*) no início do amadurecimento, na fase de colheita, ficando assim conhecida como a mosca-do-figo (VILELA, 1999; VILELA et al., 2001). No Nordeste do Brasil, a mosca-do-figo foi encontrada em 2000, na região do Vale do Rio São Francisco, em Sobradinho/Bahia e no mesmo ano, foi coletada na zona da mata e litoral de Pernambuco e da Paraíba, demonstrando assim grande capacidade de disseminação (SANTOS et al., 2003).

Na região Afro-tropical, imagos de *Z. indianus* podem ser encontrados em vários frutos cultivados como: cajá-mirim, mamão, goiaba, abacaxi, cítricos, manga, entre outros. Entretanto, na região Nordeste do Brasil, essa espécie vem atacando frutos como: umbu (*Spondias tuberosa*), sirigüela (*Spondias purpurea*), Jenipapo (*Genipa americana*) e jambo (*Syzygium malaccense*), formando reservatórios naturais, podendo reinfestar áreas de fruticultura (SANTOS et al., 2003). Por tratar-se de uma espécie semicosmopolita, polífaga e com ciclo de vida curto (aproximadamente 16 dias) (STEIN et al., 2003) deverá expandir-se rapidamente pelo continente americano.

A produção de figos, na década de 90, ocupou lugar de destaque dentre várias espécies de frutas exportadas para a Europa, alcançando faturamento de aproximadamente R\$ 4.000.000,00. Devido à infestação dos frutos, lotes foram devolvidos, causando perdas da ordem de 50% da produção (VILELA et al., 2001). O emprego de produtos químicos para controlar esse inseto aumentará o custo da produção e poderá inviabilizar a exportação dos frutos, pois vários países impõem restrição aos

resíduos de determinados produtos químicos (RAGA et al., 2003). Uma alternativa viável é o Controle Biológico utilizando fungos entomopatogênicos, pois os mesmos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro, como ovo, larva, pupa e adulto, sendo esta característica desejável e peculiar desse grupo (ALVES, 1998).

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin (Anamorfo) (KENDRICK, 1992; ALEXOPOULOS et al., 1996) vem sendo utilizado com sucesso no controle de pragas, tanto no exterior quanto no Brasil (MENDONÇA, 2005). É comprovadamente patogênico e virulento a dípteros, como a mosca doméstica (*Musca domestica*), a mosca africana tsé-tsé (*Glossina* spp), a mosca da fruta (*Ceratitis capitata*), a mosca causadora de miíases em animais (*Cochliomyia macellaria*) e o mosquito transmissor da malária (*Anopheles gambiae*), entre outros (MANIANIA, 1998; CASTILLO et al., 2000; DARWISH & ZAYED, 2002; MACIEL et al., 2005; SCHOLTE et al., 2006).

Carneiro-Leão (2006) avaliou a patogenicidade de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* contra *Z. indianus* e obteve resultados significantes quanto a redução da emergência de adultos a partir de larvas infectadas. Portanto, o estabelecimento de um método de Controle Biológico para *Z. indianus* constituirá numa alternativa, para minimizar os prejuízos causados por esta mosca à fruticultura de interesse econômico. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a infectividade de *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 sobre larvas e adultos de *Z. indianus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Taxonômicos e Biológicos de *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin foi classificado pela primeira vez como *Entomophora anisopliae*, quando Metschnikoff o isolou da larva de *Anisopliae austriaca*, besouro do trigo, em 1879, na Rússia. Um ano depois, o mesmo pesquisador o reclassificou como *Isaria destructor*. A partir daí, a espécie recebeu várias denominações, até que em 1883, na França, Delacroix o registrou como *Oospora destructor* (Metsch). No mesmo ano, Sorokin o pôs em sinonímia, conferindo ao isolado a denominação de *M. anisopliae*, aceita até os dias atuais (LUNA-ALVES LIMA, 1985).

Gams & Rozsypal (1973) descreveram pela primeira vez a espécie *M. flavoviride* que foi isolada de larvas e pupas de curculionídeos e de solos cultivados, na Europa. Os autores separaram *M. flavoviride* de *M. anisopliae* pelo tamanho do conídio e tipo de fiálide, pois citaram que *M. flavoviride* apresenta conídios elipsóides, variando de 7,0-9,0 x 4,5-5,5 µm e fiálides clavadas, enquanto *M. anisopliae* apresenta fiálides e conídios cilíndricos, variando de 3,0-5,0 x 2,0-3,0 µm.

Tulloch (1976) reconheceu duas espécies para o gênero *Metarhizium* (*M. anisopliae* e *M. flavoviride*) e propôs, com base no tamanho dos conídios, duas variedades para *M. anisopliae*: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin var. *anisopliae* (3,5-9,0 µm) e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin var. *major* (Johnston) Tulloch (9,0-18,0 µm). Mais tarde, uma nova variedade foi proposta para *M. flavoviride*: *M. flavoviride* Gams & Rozsypal var. *minus* Rombach, Humber & Roberts, esta apresentando conídios que variam de 4,5-7,0 x 2,0-3,0 µm (ROMBACH et al., 1986).

Driver et al. (2000) revisaram e caracterizaram as espécies *M. anisopliae*, *M. album* e *M. flavoviride*, utilizando RAPD e dados das regiões ITS e 28S do rDNA. O dendrograma gerado revelou 10 grupos distintos, dentre estes, dois foram descritos como variedades novas de *M. anisopliae*: *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (conhecida anteriormente como *M. anisopliae* var. *anisopliae*) e *M. anisopliae* var. *acridum* (conhecida anteriormente como *M. flavoviride* var. *minus*). A partir daí, duas espécies de *M. flavoviride* var. *minus*, isoladas de gafanhotos (Acrididae) e uma espécie de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, passaram a sinonímia de *M. anisopliae* var. *acridum*, aceita atualmente

pela comunidade científica (MAGALHÃES et al., 2000; ARTHURS & THOMAS, 2001; OUEDRAOGO et al., 2003).

A subdivisão Deuteromycotina, a qual pertencia a maioria dos fungos entomopatogênicos foi renomeada, passando a se chamar Anamorfos (KENDRICK, 1992; ALEXOPOULOS et al., 1996), pois sua fase sexuada é desconhecida. Estes fungos não possuem relação filogenética com os demais, considerados perfeitos, são fases conidiais dos Ascomycotina ou mais raramente, dos Basidiomycotina. Como Anamorfo, *M. anisopliae* possui um método alternativo para garantir sua diversidade genética: o ciclo parassexual. (MESSIAS & AZEVEDO, 1980).

No ciclo parassexual são originados esporos assexuais diplóides que em condições favoráveis dão origem a colônias também diplóides. Estas, por sua vez, podem perder cromossomos, por não-disjunção, originando novamente haplóides, que podem ser recombinantes. Quando ocorre variação no ciclo parassexual, como a formação de haplóides sem aparente formação do diplóide ou este é altamente instável, diz-se que ocorreu a parameiose (PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1991). A partir da descoberta do ciclo parassexual, surgiu a possibilidade de recombinação entre linhagens com características diversas que poderiam ser unidas em uma nova linhagem (AZEVEDO, 2000).

M. anisopliae pode ser isolado de insetos ou do solo, é uma das espécies fúngicas mais importantes como entomopatógeno, nas condições climáticas brasileiras, capaz de infectar mais de 300 espécies de insetos (ALVES, 1998). O tempo de preservação e a viabilidade dos conídios são um dos principais obstáculos para sua utilização como agente de controle microbiano (MARQUES & ALVES, 1996). Seu limite de temperatura, para crescimento, varia de 5 a 40°C, mas a temperatura ótima é de aproximadamente 28°C, porém após 30 dias, a essa temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) o micélio fúngico tem sua viabilidade reduzida (HALLSWORTH & MAGAN, 1999; MARQUES et al., 1999). Entretanto, isolados da região sub-Antártica germinaram a 2,5° C, após 49 dias (RODDAM & RATH, 1997).

Liu et al. (2001) encontraram em coletas na China, uma espécie fúngica desconhecida que atacava a larva de um besouro subterrâneo (Coleoptera: Scarabaeidae). Este fungo foi descrito então, como *Cordyceps brittlenbankisoides* Liu, Liang, Whalley, Yao and Liu, teleomorfo de *M. anisopliae* var. *majus*. A identificação foi realizada com base em caracteres morfológicos e confirmada pelo seqüenciamento do DNA do estroma, onde não havia bases diferentes entre o teleomorfo e seu anamorfo. Porém, a literatura

ainda não cita o teleomorfo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* portanto, somente o anamorfo está disponível para estudos morfológicos e moleculares.

2.2 Controle Biológico por Fungos Entomopatogênicos

O emprego de fungos entomopatogênicos no Controle Biológico de insetos-praga tem recebido especial atenção, por serem os fungos os principais patógenos de insetos, causando mais de 80% de suas doenças. Esses agentes foram os primeiros a serem utilizados no controle microbiano. Podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro e, além disso, são especializados na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que penetram por via oral (ALVES, 1998).

Os fungos que crescem dentro dos tecidos do hospedeiro, têm a característica de matar o inseto em poucas semanas ou dias, contudo sua utilização com sucesso no Controle Biológico depende, dentre outros fatores, da qualidade do isolado a ser aplicado, quantidade de inóculo, viabilidade e virulência dos conídios, condições climáticas favoráveis e correta forma de aplicação (MACCHERONI JR. et al., 2004; MENDONÇA, 2005).

Após a deposição do fungo sobre o inseto ocorre a adesão e posterior penetração. Nesta fase, estão envolvidos processos físicos e mecânicos, devido a pressão da ponta da hifa rompendo áreas membranosas ou esclerosadas e o processo químico ou enzimático, resultante da elaboração de enzimas (proteases, quitinases e lipases) (ALVES, 1998). Destas, a protease e a quitinase são as principais enzimas envolvidas na infecção, pois alteram a superfície do tegumento liberando peptídeos que servirão de nutrientes para o fungo e substratos para a elaboração de outros determinantes da patogenicidade (ST. LEGER et al., 1998; MACCHERONI JR et al., 2004).

O registro fóssil de patógenos microbianos de insetos é quase inexistente, consiste apenas de três amostras em âmbar, onde o fungo está se exteriorizando pela cutícula, tórax e abdômen de mosquitos adultos da ordem Diptera (famílias Culicidae e Mycetophilidae); após análise, os fungos foram identificados como pertencentes à classe Trichomycetes (POINAR JR & POINAR, 2005), fungos que estão associados ao trato digestivo de artrópodes.

2.3 Controle Biológico por *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae é patogênico e comprovadamente virulento a diversas ordens de insetos-praga. Vem sendo testado e empregado com sucesso no controle de importantes pragas agrícolas no Brasil e no exterior (MENDONÇA, 2005). O controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* Stal) (Hemiptera: Cercopidae), no Nordeste do Brasil, constitui o programa mais bem sucedido utilizando este fungo como biocontrolador, onde 474 mil hectares de canaviais infestados por essa praga foram tratados com aproximadamente 38 mil quilos de conídios de *M. anisopliae*, no período de 1970-1991 (MARQUES & ALVES, 1996; ALVES, 1998; MENDONÇA, 2005).

Athayde et al. (2001) analisaram a ação patogênica de *M. anisopliae* sobre teleógenas de *Boophilus microplus* Canestrini, carrapato bovino, (Acari: Ixodidae). A mortalidade superior a 90% dos indivíduos possibilita testes posteriores em campo para o controle desse carrapato. Foi comprovado também, que a infecção de larvas de *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) com *M. anisopliae* reduziu o consumo diário de alimento entre 70-85%, quando estas foram tratadas com 1×10^8 conídios/mL. Os autores ainda sugerem que a redução no consumo de alimento pode compensar a velocidade lenta de morte ocasionada pelos fungos (TEFERA & PRINGLE, 2003).

M. anisopliae quando testado contra operárias de *Atta sexdens sexdens* Linnaeus (Hymenoptera: Formicidae) apresentou TL_{50} de 2,5 dias na concentração de 1×10^9 conídios/mL e mortalidade total de 34% após 3 dias de infecção (LOUREIRO & MONTEIRO, 2004). Testando-se a virulência de *M. anisopliae* contra a barata alemã *Blatella germanica* Linnaeus (Blattodea: Blattellidae), por transmissão horizontal de infectadas para não-infectadas (na razão de 1:10), a mortalidade foi de 87,5% e o TL_{50} de 12,2 dias, indicando a eficiência desse fungo em ser transmitido horizontalmente e em espalhar infecção na população do inseto (MORAGA et al., 2004).

Albuquerque et al. (2005) estudaram a ação de *M. anisopliae* sobre o cupim do montículo *Nasutitermes coxipoensis* Holmgren (Isoptera: Termitidae) e constataram que esse fungo tem potencial para o Controle Biológico desse cupim, pois ao 3º dia pós-tratamento, 100% dos insetos tratados estavam mortos. No mesmo sentido, Wright et al. (2005) relataram o primeiro registro de um agente biocontrolador para cupins alados (*Coptotermes formosanus* Shiraki), onde a concentração de 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae* matou 100% dos insetos em três dias, sugerindo seu potencial para controlar cupins no campo.

Almeida (2005) testou a patogenicidade de *M. anisopliae* ao bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae); os insetos adultos tiveram mortalidade de 86-94% nos tratamentos de 10^7 e 10^8 conídios/mL e em segundo lugar ficou a mortalidade de ovos (89,6%), seguida da mortalidade de larvas (88,5%).

Avaliando o efeito de *M. anisopliae* sobre ninfas dos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), em laboratório, 100% de mortalidade dos insetos ocorreu logo após cinco dias da infecção, no tratamento com 1×10^8 conídios/mL. A espécie mais suscetível à infecção foi *Myzus persicae* com TL_{50} de 1,76 dias, enquanto para *Aphis gossypii* o TL_{50} foi alcançado com 1,98 dias (LOUREIRO & MOINO JR, 2006). Por outro lado, França et al. (2006) avaliaram os efeitos de *M. anisopliae* sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) e verificaram mortalidade de 72% de ninfas, com tratamento tópico, mas não houve confirmação de mortalidade de adultos. Isso indica que a variabilidade existente entre linhagens fúngicas, implica em diferentes respostas do hospedeiro ao entomopatógeno.

2.4 Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* a Dípteros

Vários estudos vêm sendo feitos para se verificar a ação de *M. anisopliae* contra dípteros e ficou comprovada sua patogenicidade também a insetos dessa ordem.

M. anisopliae preveniu a emergência de adultos de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera: Muscidae) nas concentrações mais altas (10^7 a 10^8 conídios/mL) e reduziu a emergência em doses baixas (10^5 e 10^6 conídios/mL), demonstrando que tem potencial para controlar os estágios larvais dessa mosca. Além disso, foi eficiente também contra adultos dessa espécie, alcançando alta mortalidade num curto período de tempo e em baixa concentração (1×10^5 conídios/mosca) (BARSON et al., 1994).

Foi investigado o efeito de *M. anisopliae* nos estágios larval e pupal da mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) (Diptera: Glossinidae) e verificou-se que este fungo induziu alta mortalidade (80%) nos adultos recém emergidos entre 2 e 10 dias (KAAYA & MUNYINYI, 1995). Em testes de campo, com insetos adultos em câmaras especiais contendo conídios fúngicos, a mortalidade também alcançou 80%, como relatou Maniania (1998) quando testou essa mesma mosca.

Adultos de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) foram susceptíveis a infecção por *M. anisopliae*, alcançando 88% de mortalidade ao 6º dia pós-infecção. Adicionalmente, fêmeas expostas ao tratamento fúngico tiveram sua fecundidade e fertilidade reduzida. Estes efeitos são importantes, pois contribuirão para a redução da população de moscas no campo (CASTILLO et al., 2000). Também foi constatado que o mais alto índice de mortalidade pupal de *C. capitata* no solo se deu em altas temperaturas (20-30° C) e em baixa umidade (EKESI et al., 2003), confirmando que estes fatores influenciam na viabilidade dos conídios.

Feijó (2004) avaliou a ação de *M. anisopliae* sobre ovos, larvas e adultos de *Chrysomya albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) e constatou que houve redução no percentual de eclosão de larvas e na emergência de adultos e, além disso, o fungo afetou a longevidade dos adultos, principalmente dos machos. Ensaios de laboratório testando a aplicação de *M. anisopliae* no solo, contra larvas de *Delia radicum* Linnaeus (Diptera: Anthomyiidae), praga do repolho, mostraram mortalidade larval significativa (85%) após 14 dias de infecção (BRUCK et al., 2005).

Recentemente, foram feitos estudos de patogenicidade de *M. anisopliae* contra *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae), mosquito transmissor da malária, e foi verificada a redução na quantidade de ingestão de sangue pelas fêmeas infectadas, com conseqüente redução na postura de ovos (SCHOLTE et al., 2006). Os autores concluíram que a redução no número de refeições por mosquito reduz o risco de transmissão da malária e ainda sugerem que este fungo pode ter potencial como agente biocontrolador do inseto.

Campbell et al. (2006), estudando em campo os efeitos de *M. anisopliae* sobre larvas de *Tetanops myopaeformis* Röder (Diptera: Otitidae), em plantações de beterraba, na América do Norte constataram que as áreas tratadas com conídios produziram mais açúcar/ha do que a área controle (sem fungo e sem inseticida). Isto é uma forte evidência da habilidade do fungo em controlar o inseto, refletida no aumento linear na produção de açúcar.

2.5 *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) (Mosca-do-Figo)

A família Drosophilidae apresenta distribuição mundial e é composta por cerca de 3 000 espécies de moscas de pequeno porte, comumente chamadas moscas-das-frutas, agrupadas em 62 gêneros (WHEELER, 1986); entre estes, está o gênero *Zaprionus*, que contém dois subgêneros *Zaprionus* e *Anaprionus*, abrangendo 57 espécies, ambos apresentando faixas longitudinais (GUPTA & GUPTA, 1970), sendo que no subgênero *Zaprionus* as faixas se apresentam em número par, enquanto que em *Anaprionus*, elas estão em número ímpar (VAN DER LINDE et al., 2006).

Z. indianus Gupta é uma mosca de aproximadamente 2,5 – 3,0 mm de comprimento e caracteriza-se por apresentar na região dorsal da cabeça e tórax, faixas longitudinais branco-prateadas, geralmente bordejadas por estreitas faixas negras, que contrastam fortemente com a área castanho-aveludada adjacente. Os ovos são de coloração leitosa, fusiformes, tendo em uma de suas extremidades 4 filamentos. A larva é vermiforme, com coloração branco-leitosa e o pupário tem coloração castanha (Figura 1) (VILELA et al., 2001).

O período de incubação dos ovos está em torno de 1,28 dias e o ciclo de ovo a adulto está em volta de 16,78 dias (Figura 1). Os adultos mantidos a temperatura de 25 ± 1 °C podem sobreviver por mais de 80 dias (STEIN et al., 2003). Em experimentos de laboratório, com temperatura controlada (25 ± 1 °C) e umidade não controlada, as fêmeas viveram mais do que os machos; os machos viveram em média, $81,7 \pm 5,0$ dias e as fêmeas, $92,6 \pm 4,6$ dias. O tempo médio de desenvolvimento para ovo-pupa, pupa-imago e ovo-imago foi de 12,7, 5,8 e 18,5 dias, respectivamente (SETTA & CARARETO, 2005).

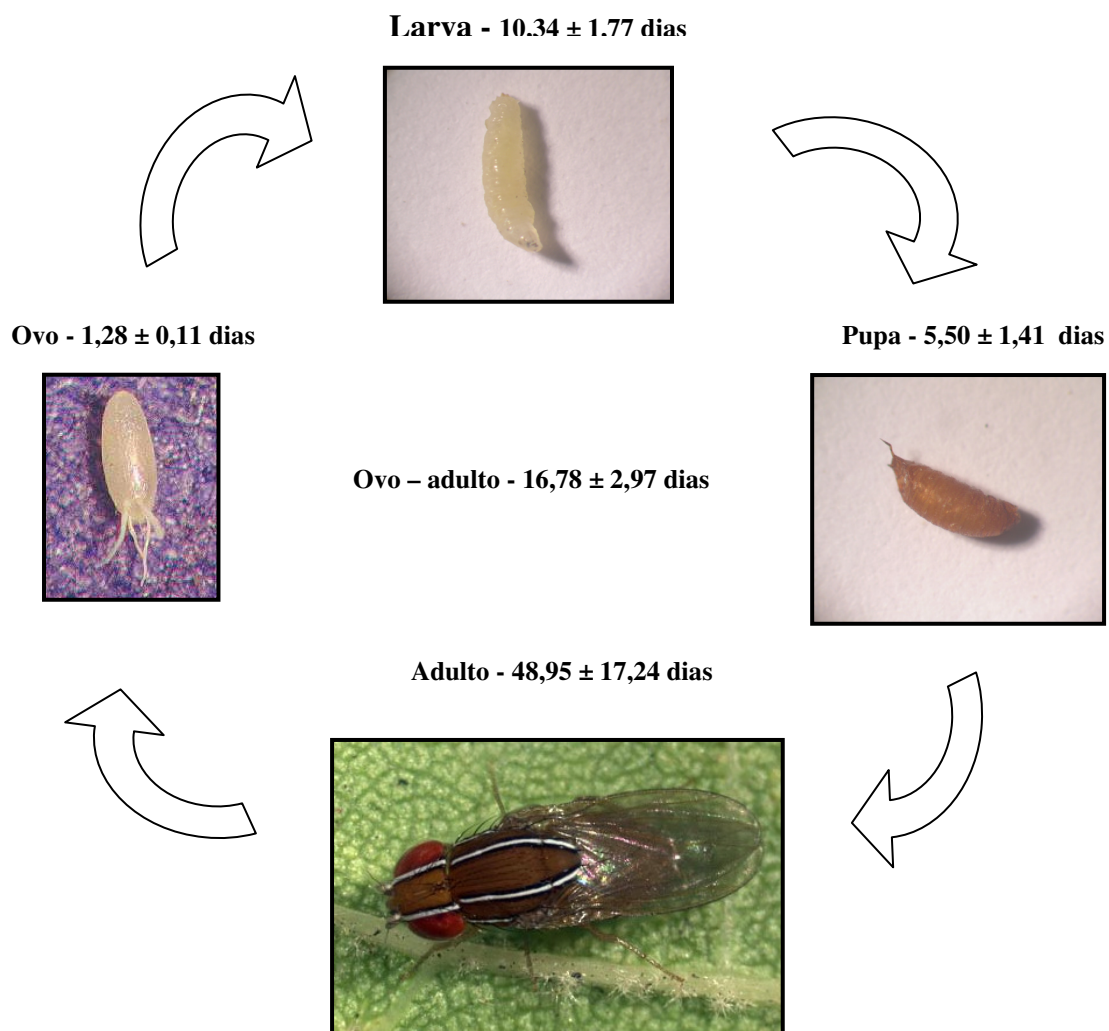


Figura 1. Ciclo de vida de *Zaprionus indianus*, adaptado (STEIN et al., 2005; VAN DER LINDE, 2005).

Disponível em: <http://www.iac.br/~centif/artigos/zaprionus;>

<http://www.kimvdlinde.com/professional/index.html>.

As espécies de *Zaprionus* ocorrem principalmente nas regiões Afrotropical, Oriental e Australiana, porém *Z. indianus* parece ser a única espécie que está se espalhando pelos trópicos, provavelmente devido à intensificação do comércio mundial de frutas. A primeira ocorrência desta mosca no continente Americano foi registrada no Brasil, em 20 de março de 1999, no Estado de São Paulo, pelo Prof. Dr. Carlos R. Vilela, da Universidade de São Paulo, onde foram observados adultos sobre caquis (*Diospyros kaki* Linnaeus) caídos no solo, em início de decomposição (VILELA, 1999; VILELA et al., 2001).

Na mesma época foram coletados adultos desta mesma espécie se alimentando e fazendo postura, próximo ao ostíolo de figos (*Ficus carica* Linnaeus) em início de maturação, quando é realizada a colheita, tornando-se conhecida como a mosca-do-figo (VILELA, 1999). Em decorrência da introdução da mosca africana no país e da infestação dos figos, foram registradas as primeiras devoluções de lotes de figos exportados, causando perda da ordem de 50% da produção (Figura 2) (VILELA et al., 2001).

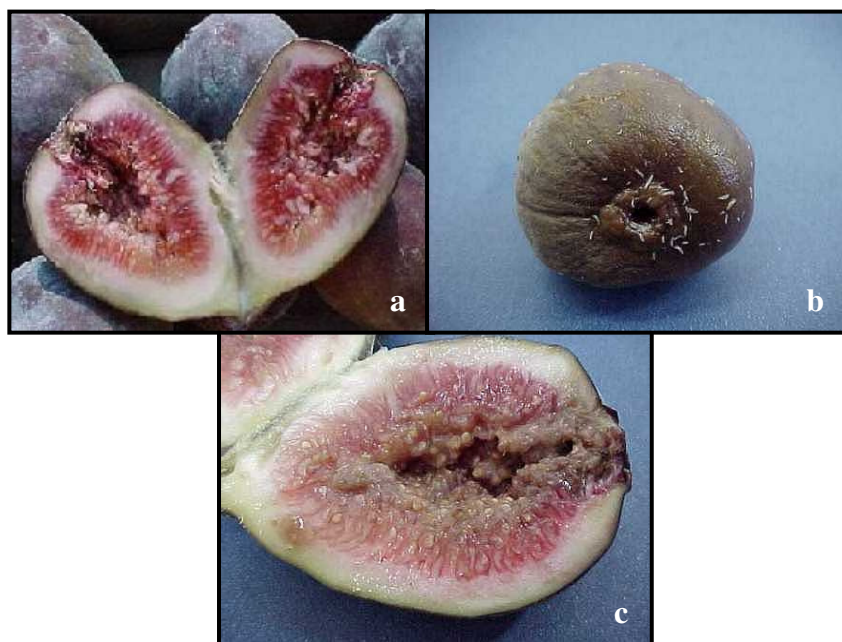


Figura 2. Figo sadio (a) e figo infestado por *Zaprionus indianus* (b- ostíolo, c- polpa).

Fonte: STEIN et al., (2005).

Disponível em: <http://www.iac.br/~centif/artigos/zaprionus>;

Z. indianus, como a maioria dos drosofilídeos, alimenta-se fundamentalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, especialmente frutos em decomposição. As substâncias voláteis que se originam durante o processo de fermentação destes substratos funcionam como o principal atrativo para estas moscas, sendo utilizado como local de alimentação, corte e oviposição, e pelas larvas, como sítio de desenvolvimento e por vezes, de pupação. Gomes et al. (2003) caracterizaram leveduras isoladas de figos infestados por *Z. indianus* e todos os isolados foram identificados como *Candida tropicalis* demonstrando uma interação entre estas duas espécies.

Como as condições climáticas do Brasil são favoráveis a essa espécie, um mês depois da sua descoberta, em São Paulo, espécimes de *Z. indianus* foram coletados no Brasil Central, nas proximidades de Brasília; um ano depois, em agosto de 2000, nos cerrados do Estado de Rondônia e na cidade de São Luís (MA). Em Dezembro de 2000, foi coletado um macho de *Zaprionus* em Igarapé-Açu (PA), o primeiro registro desta espécie na Amazônia (TIDON et al., 2003). Os autores relataram que as populações de *Z. indianus* são mais abundantes durante a estação chuvosa e em ambientes com vegetação aberta, como o cerrado, porque essas condições assemelham-se às suas de origem, na África.

Na região Nordeste do Brasil, a mosca-do-figo foi encontrada em 2000, na região do Vale do Rio São Francisco, em Sobradinho/Bahia, pela equipe do Setor de Drosofilídeos, do Laboratório de Genética Animal (Depto. Genética/CCB/UFPE), atacando frutos nativos como: umbu (*Spondias tuberosa*), sirigüela (*Spondias purpurea*), Jenipapo (*Genipa americana*) e jambo (*Syzygium malaccense*). Alcançou frequência de 37%, tornando-se o mais comum dos drosofilídeos nesta região, formando reservatórios naturais de onde poderá reinfestar áreas de fruticultura (SANTOS et al., 2003). Em Outubro de 2003, foram coletados alguns indivíduos de *Z. indianus* no Panamá e 2 anos depois, uma única fêmea, na Flórida (EUA) (VAN DER LINDE et al., 2006). Adicionalmente, Kato et al. (2004) reportaram a ocorrência desta espécie em vários municípios do Estado de Minas Gerais, Brasil.

Estudos feitos por Karan et al. (2000) relataram que *Z. indianus* sofre diferenciação nas suas características morfológicas (tamanho do corpo, asa e tórax) bem como nas suas características reprodutivas (número de ovários) devido a alterações geográficas (quanto à altitude, latitude e longitude). Isto sugere uma resposta adaptativa da espécie às condições locais, especialmente à temperatura. A competição inter-específica também aumenta a variação no tamanho do corpo das moscas devido à restrição

nutricional ou a contaminação do substrato por resíduos metabólicos (ácido úrico e CO₂) durante o desenvolvimento larval. Este evento pode levar a eliminação da espécie ou a coexistência entre espécies competidoras (GALEGO & CARARETO, 2005).

Na cidade de Porto Alegre (RS-Brasil) foi estudada a dinâmica populacional dessa espécie invasora (*Z. indianus*) e constatou-se que sua frequência é mais alta durante estações com maior média de temperatura (verão e primavera), com acentuada queda durante o outono e o inverno, aumentando novamente na primavera. Isto demonstra sua habilidade invasora, pois as espécies residentes (nativas) têm que promover ajustes na sua estratégia de sobrevivência para poderem coexistir ecologicamente com o invasor (SILVA et al., 2005).

O uso exclusivo de inseticidas mostrou-se ineficaz contra *Z. indianus* exigindo a adoção de diferentes técnicas de combate. Sendo assim, outras técnicas foram adaptadas por Raga et al. (2003), que testaram a eficiência de protetores de ostíolo que dificultassem a oviposição, a alimentação e consequentemente, interrompessem o ciclo da praga. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de etiqueta adesiva sobre o ostíolo dos figos, porém devido ao seu desprendimento, não impediu totalmente a infestação pela mosca. Por outro lado, Raga & Souza-Filho (2003) avaliaram a eficiência de frascos com iscas alimentares e concluíram que melaço-de-cana com figo triturado, em frasco incolor, foi o principal atrativo para a mosca-do-figo, atraindo 99,8% dos indivíduos de todo o experimento.

Pouco se sabe sobre a ação de inimigos naturais da mosca-do-figo, no Brasil. O primeiro registro publicado foi a ocorrência do parasitóide *Spalangia endius* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Z. indianus*, representando 3,8% de parasitismo (MARCHIORI & SILVA, 2003); posteriormente, espécimes de *Leptopilina boulardi* Bartbotin et. al (Hymenoptera: Figitidae) também foram encontrados em pupas de *Z. indianus*, totalizando 2,2% de parasitismo (MARCHIORI et al., 2003a; MARCHIORI et al., 2003b); em seguida, foram registrados espécimes de *Pachycrepoideus vindemiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Z. indianus* coletados em frutos de goiaba, com prevalência de parasitismo de 3,5% (SILVA et al., 2004).

Recentemente, foi testada a ação dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* var. *acridum* CG291 e *M. anisopliae* var. *anisopliae* BIO2 contra larvas de *Z. indianus* e constatou-se que este fungo tem potencial para ser utilizado como controlador biológico dessa mosca, pois reduziu significativamente o ritmo e a percentagem de

emergência de adultos desta espécie, emergindo apenas, cerca de 13% dos indivíduos infectados (CARNEIRO-LEÃO, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de experimentos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Citologia e Genética de Fungos Filamentosos e de Controle Biológico por Fungos Entomopatogênicos (Depto. Micologia/CCB/UFPE) e no Laboratório de Genética Animal (Depto. Genética/CCB/UFPE).

3.2 Linhagens fúngicas utilizadas

As linhagens utilizadas foram cedidas pela Coleção de Culturas da Micoteca–URM do Departamento de Micologia/CCB/UFPE, conforme Tabela 1:

Tabela 1. Linhagens fúngicas utilizadas.

Espécie	Nº acesso na Micoteca	Código da Linhagem	Hospedeiro de Origem	Local	Ano de Isolamento
<i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	URM3349	PL ₄₃	<i>Mahanarva posticata</i> (Hemiptera: Cercopidae)	AL/Brasil	1991
<i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	URM4403	PL ₅₇	<i>Mahanarva posticata</i> (Hemiptera: Cercopidae)	PE/Brasil	1991

3.3 Espécie da mosca utilizada

A espécie utilizada foi a *Zaprionus indianus*, de código VVI, proveniente da localidade de Vila Velha Itamaracá, fornecida pelo Laboratório de Genética Animal/CCB/UFPE, onde é mantida em dieta artificial específica para drosofilídeos, a 25° C.

3.4 Meios de cultura utilizados

3.4.1 Batata-Dextrose-Ágar (BDA) – (OXOID)

3.4.2 Dieta para larvas e adultos de *Zaprionus indianus* (CAMPOS, 2003)

Água destilada.....	800 mL
Banana madura amassada.....	50g
Farinha de milho.....	100g
Fermento fresco.....	30g
Nipagin em 10 mL de álcool 95°.....	4g

3.5 Soluções Empregadas

Solução Tween 80 (0,05% v/v), hipoclorito de sódio (4%) e álcool (70%).

3.6 Bioensaios

Os bioensaios foram elaborados para avaliar a infectividade de *M. anisopliae* URM3349 e de *M. anisopliae* URM4403 a larvas de 3° estágio (L3) e a adultos de *Z. indianus*, em ambiente climatizado (25±1°C) e umidade relativa de 70±10%. Cada bioensaio foi realizado em triplicata.

3.6.1 Produção de conídios em arroz (VILAS BOAS et al. 1996).

Sacos de polipropileno contendo 100g de arroz parboilizado, previamente autoclavados, foram inoculados com 10 mL de uma suspensão de conídios (10^8 conídios/mL) de *M. anisopliae* URM3349 ou de *M. anisopliae* URM4403, com 12 dias de crescimento em BDA. Após a inoculação e homogeneização, os sacos foram mantidos em BOD a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e aguardado o crescimento fúngico por 12 dias, para o preparo das suspensões.

3.6.2 Quantificação do inóculo (ALVES & MORAES, 1998).

Um grama de arroz, contendo o fungo, *M. anisopliae* URM3349 ou *M. anisopliae* URM4403, foi agitado em 100 mL de água destilada com Tween 80 (0,05%). Após agitação, a suspensão foi quantificada com auxílio de Câmara de Neübauer e ajustada para a concentração de 10^8 conídios/mL. A partir desta concentração foram feitas diluições sucessivas até obter-se concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios/mL.

3.6.3 Viabilidade de Conídios (ALVES & PEREIRA, 1998).

A viabilidade dos conídios foi verificada através da sua germinação. Conídios da cultura fúngica, com 12 dias de crescimento, foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 mL de Tween 80 (0,05%). A suspensão foi quantificada com auxílio de uma Câmara de Neübauer e ajustada para a concentração de 10^8 conídios/mL. Desta, 0,1 mL foi semeado em placas de Petri, utilizando uma alça de Drigalsky, contendo meio BDA, com cinco repetições. As placas foram mantidas a $28\pm 1^\circ\text{C}$. O percentual de germinação foi determinado contando-se 500 conídios por placa (germinados e não germinados), após 16 horas da semeadura. Utilizou-se a seguinte fórmula para obtenção do percentual de germinação:

$$G = \frac{N \times 100}{500}$$

N = número de conídios germinados.

3.6.4 Bioensaio com larvas de *Zaprionus indianus* (MACIEL et al., 2005).

O bioensaio foi realizado com um grupo controle, tratado com água destilada e Tween 80 (0,05%) e cinco tratamentos nas concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* URM3349 e de *Metarhizium anisopliae* URM4403. Para cada concentração testada, foram utilizadas cinco repetições, com 10 larvas de 3º estágio (L3) cada. As larvas foram retiradas da dieta artificial com o antifúngico Nipagin, e passadas para outra, sem o antifúngico, um dia antes da infecção. No dia seguinte, as mesmas foram imersas em cada suspensão, durante 10 segundos, em seguida o excesso da suspensão foi desprezado e as larvas transferidas para vidros contendo meio específico para drosofilídeos, sem o antifúngico. Foram feitas observações diárias para análise dos parâmetros biológicos: período de pré-pupa, estágio pupal, ritmo de emergência e percentual de emergência de adultos.

3.6.5 Bioensaio com adultos de *Zaprionus indianus* (TEFERA & PRINGLE, 2003).

O bioensaio foi realizado com um grupo controle tratado com água destilada e Tween 80 (0,05% v/v) e cinco tratamentos nas concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* URM3349 e de *Metarhizium anisopliae* URM4403. Para cada concentração testada, foram utilizadas cinco repetições, cada uma com 10 moscas. As suspensões foram aplicadas pelo método de pulverização, sobre os indivíduos imobilizados com éter. Após o tratamento, as moscas foram mantidas em vidros contendo meio específico para drosofilídeos. Foram feitas observações diárias para análise da mortalidade de adultos.

3.6.6 Produção de conídios em cadáveres de *Zaprionus indianus* (DIMBI et al., 2003b).

Cinco insetos adultos mortos, após 10 dias, foram transferidos individualmente para vidros com tampa de rosca contendo um mL de Tween 80 (0,05%). Após agitação em Vortex, por 2 a 3 minutos, para desprendimento dos conídios da

superfície do inseto, a quantidade de conídios/mL foi determinada, com o auxílio de uma câmara de Neübauer.

3.6.7 Reisolamento de linhagens de *Metarhizium anisopliae* a partir de *Zaprionus indianus* (ALVES, 1998).

Uma parcela de larvas e adultos mortos foi lavada em álcool (70%), hipoclorito de sódio (4%) e água destilada autoclavada, por 2 segundos, três minutos e três minutos, respectivamente. Em seguida, os indivíduos foram secos em papel filtro esterilizado e mantidos em câmara úmida, em BOD ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$) a 80% de umidade relativa, para a exteriorização fúngica. O fungo foi reisolado em BDA + antibiótico (Cloranfenicol) para análise das microestruturas e do diâmetro da colônia.

3.7 Aspectos Morfológicos do Reisolado

3.7.1 Análise das Microestruturas

Fragmentos fúngicos foram inoculados em pontos equidistantes da placa de Petri contendo meio BDA e cobertos com lamínulas previamente flambadas. Após 24, 48, 72 e 96 horas, uma lamínula foi retirada, montada, corada com azul de Aman e observada ao microscópio óptico.

3.7.2 Diâmetro da Colônia

Fragmento fúngico foi inoculado no centro da placa de Petri contendo meio BDA. O diâmetro da colônia foi medido, com o auxílio de uma régua milimetrada, a cada três dias de crescimento, durante 15 dias. O experimento consistiu de cinco repetições.

3.8 Análise Estatística

Para análise estatística, os dados foram submetidos à análise de *Probit* para obtenção da CL_{50} (programa POLO PC) e ao teste F (ANOVA) (programa STATISTIX 7.0). No caso de diferença significativa na aplicação do ANOVA foi utilizado o teste de Duncan (programa SAEG 5.0) a 5% de probabilidade, para comparação pareada das médias (EUCLYDES, 1983).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioensaio com larvas de *Zaprionus indianus*

Nos testes de viabilidade, o percentual de germinação dos conídios de *M. anisopliae* URM3349 e *M. anisopliae* URM4403 variou entre 97 e 99%, após 16 horas de inoculação, estando assim viáveis para a utilização nos bioensaios.

O período médio do estágio de pré-pupa das larvas de *Z. indianus* tratadas com as duas linhagens de *M. anisopliae* ficou entre 1,12 e 2,02 dias, não diferindo significativamente do grupo controle (1,30 dias) (Tabela 2). O estágio pupal das larvas submetidas ao tratamento fúngico teve variação de 5,22 a 6,33 dias, mas não diferiu significativamente do grupo controle (5,93 dias) (Tabela 2). Sendo assim, o período de pré-pupa e o estágio pupal provenientes das larvas tratadas com *M. anisopliae* não sofreram mudanças significativas, com nenhuma das linhagens testadas.

Os resultados obtidos assemelham-se aos de Kaaya & Munyinyi (1995) que também não observaram mortalidade larval ou pupal quando infectaram larvas de *Glossina* spp com *Beauveria bassiana* e com *M. anisopliae*, porém uma alta mortalidade foi observada nos adultos recém-emergidos. Além disso, Darwish & Zayed (2002) enfatizaram que os efeitos da infecção em larvas são demonstrados em estágios posteriores, como na redução da emergência de adultos, o que será discutido adiante. Mas, esses resultados contrastaram com os encontrados por Maciel et al. (2005), onde o fungo *B. bassiana* interferiu nos estágios pré-pupal e pupal da mosca *Cochliomyia macellaria*, promovendo inviabilidade pupal. Do mesmo modo, o estágio pupal de *Chrysomya albiceps* também aumentou quando as larvas foram tratadas com *M. anisopliae*, porém o período de pré-pupa diminuiu significativamente nas concentrações de 10^5 a 10^8 conídios/mL, sugerindo uma reação do inseto ao tratamento fúngico (FEIJÓ, 2004). Segundo Ekesi et al. (2003) a temperatura e a umidade são os fatores mais importantes na mortalidade pupal e na emergência de moscas (*Ceratitis capitata*), pois o mais alto índice de mortalidade pupal se deu entre 20-30° C, em baixa umidade.

Tabela 2. Período médio de pré-pupa e estágio pupal de *Zaprionus indianus*, em dias, a partir de larvas infectadas com *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403.

ESTÁGIO	TRATAMENTO	LINHAGENS	
		URM3349	URM4403
PRÉ-PUPA	Controle	1,30 (A,a) ¹	1,30 (A,a) ¹
	10 ⁴	1,68 (A,a)	1,12 (A,a)
	10 ⁵	1,60 (A,a)	1,23 (A,a)
	10 ⁶	1,78 (A,a)	1,33 (A,a)
	10 ⁷	1,70 (A,a)	1,53 (A,a)
	10 ⁸	2,02 (A,a)	1,50 (A,a)
	CV (%)= 41,3954		
PUPA	Controle	5,93 (A,a) ¹	5,93 (A,a) ¹
	10 ⁴	5,22 (A,a)	5,27 (A,a)
	10 ⁵	5,32 (A,a)	5,47 (A,a)
	10 ⁶	5,58 (A,a)	6,20 (A,a)
	10 ⁷	5,77 (A,a)	6,27 (A,a)
	10 ⁸	6,00 (A,a)	6,33 (A,a)
	CV (%)= 10,3632		

¹ Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

As figuras 3 e 4 ilustram o ritmo de emergência de adultos de *Z. indianus* a partir de larvas infectadas com as linhagens de *M. anisopliae* (URM3349 e URM4403). A emergência iniciou-se entre o 6º e o 7º dia após a pupação, mas o pico de emergência de insetos foi geralmente ao 9º dia, tanto para o grupo controle (47,34%) quanto para as demais concentrações havendo, no entanto, variações entre as linhagens do 8º ao 10º dia. Observa-se que o percentual de emergência diário foi reduzido significativamente, em relação ao controle, a partir da concentração de 10⁶ conídios/mL (4% para *M. anisopliae* URM3349) até a concentração de 10⁸ conídios/mL (0,66% para *M. anisopliae* URM4403).

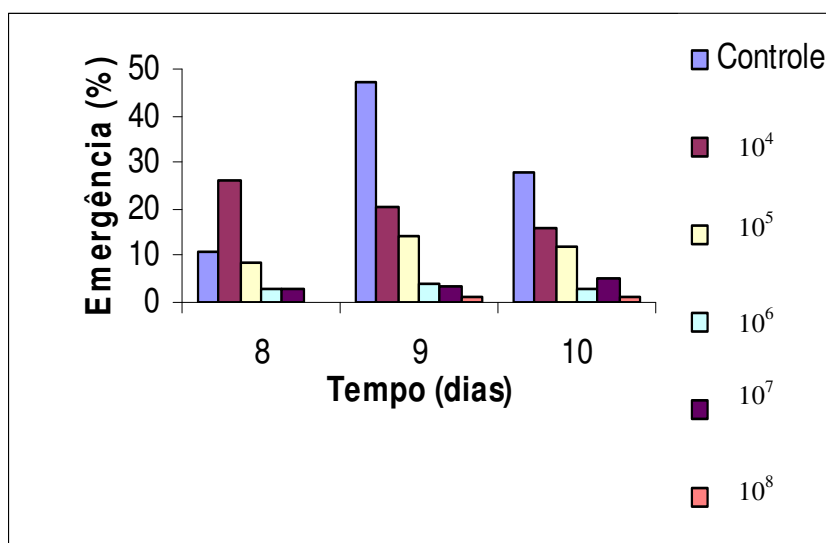


Figura 3. Ritmo de Emergência de adultos de *Zaprionus indianus*, a partir de larvas infectadas com *Metarhizium anisopliae* URM3349, em dias.

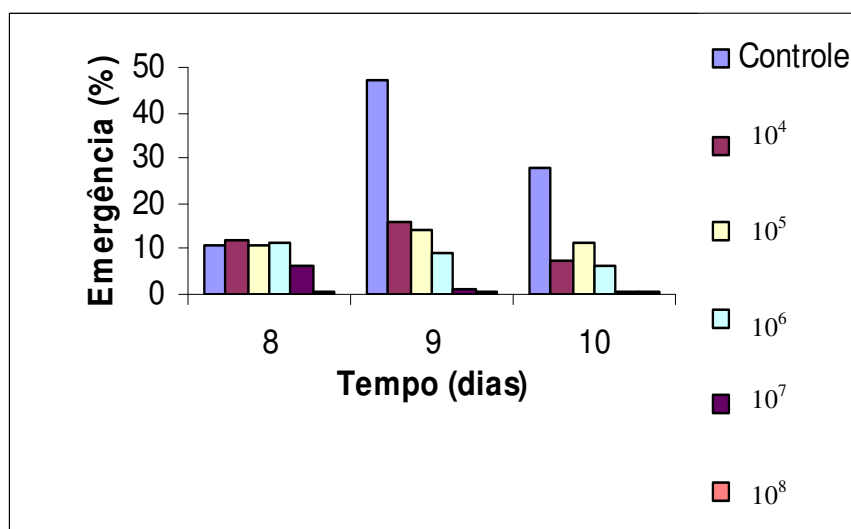


Figura 4. Ritmo de Emergência de adultos de *Zaprionus indianus*, a partir de larvas infectadas com *Metarhizium anisopliae* URM4403, em dias.

A emergência do grupo controle foi superior a de todos os tratamentos fúngicos, no 9º dia, o que é esperado para a espécie, segundo referido por Stein et al. (2003), pois o ciclo de ovo-adulto pode ter duração de até $16,78 \pm 2,97$ dias. Estes resultados são semelhantes aos de Feijó (2004) que trabalhou com o mesmo fungo, contra a mosca *C. albiceps*, pois a diminuição do ritmo diário de emergência foi proporcional ao aumento da concentração fúngica; e aos obtidos por Maciel et al. (2005), que utilizaram *B. bassiana* sobre a mosca *C. macellaria*, onde observaram que o pico de emergência ocorreu no mesmo dia para todas as concentrações testadas. Entretanto, os resultados sobre ritmo de emergência diferem dos encontrados por Carneiro-Leão (2006) quando estudou *M. anisopliae* var. *anisopliae* BIO2 contra larvas de *Z. indianus* e constatou atraso no ciclo de vida dos insetos tratados, indicando que as linhagens se comportam diferentemente entre si. No presente trabalho não foi observado retardo no ritmo de emergência de adultos, mas os sintomas da infecção foram vistos na emergência final de indivíduos, com valores bastante significativos, principalmente na concentração mais elevada.

A Tabela 3 mostra o percentual de emergência de adultos de *Z. indianus*, após as larvas serem expostas às linhagens (*M. anisopliae* URM3349 e *M. anisopliae* URM4403). Foi observado que as duas linhagens utilizadas reduziram significativamente a emergência dos insetos, em relação ao grupo controle (97,33%). Não foram observadas diferenças estatísticas entre as linhagens, exceto na concentração de 10^4 conídios/mL, mas a partir da concentração de 10^6 conídios/mL a emergência foi menor do que 14%, com *M. anisopliae* URM3349. Na concentração de 10^8 conídios/mL, menos de 3% dos insetos emergiram, confirmando assim a potencialidade das duas linhagens para o controle das larvas de *Z. indianus*.

Tabela 3. Percentual de emergência de adultos de *Zaprionus indianus*, após 14 dias da exposição das larvas a *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403.

TRATAMENTO	LINHAGENS	
	URM3349	URM4403
Controle	97,33 (A,a) ¹	97,33 (A,a) ¹
10 ⁴	70,67 (B,a)	54,00 (B,b)
10 ⁵	42,67 (C,a)	46,67 (BC,a)
10 ⁶	13,33 (D,ab)	31,33 (CD,a)
10 ⁷	14,67 (D,ab)	18,00 (D,a)
10 ⁸	2,67 (D,a)	2,00 (E,a)
CV (%) = 22,8668		

¹ Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

Em observações feitas durante os experimentos constatou-se que algumas das moscas recém-emergidas morreram logo em seguida. Esses resultados também foram verificados por Kaaya & Munyinyi (1995). Por outro lado, BARSON et al. (1994) quando testaram *M. anisopliae* contra larvas de *M. domestica*, verificaram que não ocorreu emergência nos tratamentos com 10⁷ e 10⁸ conídios/mL e que houve redução da emergência nas menores concentrações, com apenas 1% dos insetos emergindo com 10⁶ conídios/mL.

Resultados semelhantes foram encontrados por Feijó (2004) referente à diminuição da emergência à medida que as concentrações fúngicas aumentaram. Porém na concentração de 10⁸ conídios/mL 32,53% de *C. albiceps* ainda emergiram, quando tratadas com *M. anisopliae*, enquanto nesta pesquisa, a emergência na última concentração testada foi menor que 3%. Estudos anteriores de *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* contra larvas de *Z. indianus* registraram emergência final de 13,33% de adultos utilizando 10⁸ conídios/mL, para as duas variedades fúngicas (CARNEIRO-LEÃO, 2006; CARNEIRO-LEÃO et al., 2006), valores esses superiores aos obtidos neste estudo. Esses dados revelam, mais uma vez, a variação existente entre linhagens de uma mesma espécie fúngica, justificando a necessidade da seleção das mais patogênicas para o emprego em Programa de Controle Biológico.

4.2 Bioensaio com adultos de *Zaprionus indianus*

A Tabela 4 apresenta a mortalidade de adultos de *Z. indianus* infectados por *M. anisopliae*. Não foi observada diferença estatística entre as linhagens, mas independentemente da linhagem utilizada, a mortalidade foi crescente ao longo do tempo de análise. Três dias após a infecção, não houve diferença entre as concentrações fúngicas e o grupo controle, porém ao 6º dia, 50% dos insetos submetidos à concentração de 10^8 conídios/mL estavam mortos; as duas concentrações mais altas diferiram do controle, mas não entre si, o que se repetiu até o final do experimento. A partir do 9º dia, 98% dos insetos tratados com 10^8 conídios/mL estavam mortos e 100%, ao final do experimento. Aos 12 dias não houve diferença significativa entre as concentrações de 10^5 e 10^6 conídios/mL e entre esta e a concentração de 10^7 conídios/mL.

Tabela 4. Percentual da mortalidade acumulada de adultos de *Zaprionus indianus*, em diferentes dias após a exposição a *Metarhizium anisopliae*.

TRATAMENTO	TEMPO (dias)			
	3	6	9	12
Controle	8,00 A ¹	10,67 A ¹	10,67 A ¹	10,67 A ¹
10^4	4,67 A	14,33 A	31,00 AB	46,67 B
10^5	5,00 A	12,33 A	36,00 AB	63,33 BC
10^6	6,33 A	32,00 A	51,33 B	73,00 CD
10^7	6,00 A	36,67 AB	83,67 C	91,67 DE
10^8	13,33 A	61,00 B	98,00 C	100,00 E
CV (%)=	49,06	51,48	30,85	18,47

¹ Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

Conforme os dados da Tabela 5, a mortalidade dos adultos de *Z. indianus*, ao final dos 12 dias do experimento, mostrou que todas as concentrações testadas diferiram do controle, causando morte em mais de 40% dos insetos, a partir do tratamento com 10^4 conídios/mL, nas duas linhagens fúngicas. Todavia foi notado que utilizando a linhagem *M. anisopliae* URM4403 100% dos insetos estavam mortos a partir de 10^7 conídios/mL, no entanto, não houve diferença estatística entre as concentrações a partir de 10^6 conídios/mL; os experimentos com *M. anisopliae* URM3349 demonstraram que apenas a concentração mais elevada (10^8 conídios/mL) proporcionou 100% de mortalidade dos insetos, após 12 dias de análise, porém não houve diferença estatística entre esta e a concentração de 10^7 conídios/mL. A mortalidade do grupo controle foi menor que 11%.

Tabela 5. Percentual da mortalidade de adultos de *Zaprionus indianus*, após 12 dias da exposição a *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403.

TRATAMENTO	LINHAGENS	
	URM3349	URM4403
Controle	10,67 (A,a) ¹	10,67 (A,a) ¹
10^4	40,67 (B,a)	52,67 (B,a)
10^5	55,33 (B,a)	71,33 (C,a)
10^6	59,33 (B,a)	86,67 (CD,a)
10^7	83,33 (C,a)	100,00 (D,a)
10^8	100,00 (C,a)	100,00 (D,a)
CV (%)= 18,7146		

¹ Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

Não foi observado, no grupo controle, crescimento fúngico nos insetos que morreram; nos demais insetos mortos que foram submetidos às concentrações fúngicas, após seres mantidos em câmara úmida, ocorreu a exteriorização do patógeno (Figura 5), confirmando assim a infecção fúngica como a causa de morte.

Os resultados apresentados discordam dos obtidos por Barson et al. (1994), que avaliaram a eficiência de *M. anisopliae* contra adultos de *M. domestica*. Após seis dias da exposição ao fungo, todas as moscas fêmeas estavam mortas com a dose mais alta (10^5 conídios/mL). No entanto, aos 4 dias de infecção com *M. anisopliae*, as moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.) tiveram mortalidade acima de 40% (KAAYA & MUNYINYI, 1995) e em experimentos de campo, utilizando câmaras projetadas para infectar naturalmente populações dessa mosca, a mortalidade atingiu 80%, e os conídios permaneceram viáveis por mais de 21 dias (MANIANIA, 1998); esta é uma das vantagens do Controle Biológico utilizando fungos entomopatogênicos, a sua capacidade de persistência no ambiente (ALVES, 1998; MENDONÇA, 2005).

Após seis dias de infecção com 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae* aproximadamente 50% de moscas *Ceratitis capitata* estavam mortas (CASTILLO et al., 2000). Deste modo, Dimbi et al. (2003a) avaliaram o efeito da idade e do sexo do hospedeiro (*C. capitata*, *C. cosyra* e *C. fasciventis*) na suscetibilidade a *M. anisopliae* e verificaram que a idade influenciou mais na mortalidade do que o sexo; as moscas com menos de um dia de idade e as com sete dias de idade foram mais suscetíveis à infecção fúngica do que as moscas com 14 dias de idade. Além disso, após quatro dias do tratamento, um mesmo isolado fúngico causou mortalidade variando de 77 a 100% nas diferentes espécies tratadas, demonstrando que cada hospedeiro pode responder de maneira diferente a um mesmo fungo testado (DIMBI et al., 2003b).



Figura 5. Adulto de *Zaprionus indianus* colonizado por *Metarhizium anisopliae* URM3349.

Os dados da CL_{50} para adultos de *Z. indianus* foram de $1,64 \times 10^5$ conídios/mL para *M. anisopliae* URM3349 e de $1,94 \times 10^4$ conídios/mL para *M. anisopliae* URM4403 (Tabela 6). Os valores de χ^2 revelaram a homogeneidade dos dados para a equação de regressão e considerando os valores entre os intervalos de confiança, *Z. indianus* foi igualmente suscetível às duas linhagens testadas, porém a linhagem *M. anisopliae* URM4403 foi mais infectiva, numa concentração letal menor.

Tabela 6. Concentração Letal (CL_{50}) (conídios/mL) de *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 sobre adultos de *Zaprionus indianus*.

LINHAGEM	CL_{50} (IC _{0,1}) ^(a)	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO	χ^2 ^(b)
URM3349	$1,64 \times 10^5$ ($0,19 \times 10^4 - 1,14 \times 10^6$)	$Y = 2,198 + 0,537 * \log x$	8,01
URM4403	$1,94 \times 10^4$ ($0,67 \times 10^4 - 0,41 \times 10^5$)	$Y = 1,914 + 0,719 * \log x$	2,90

^(a) Intervalo de confiança significativo a 10%;

^(b) Calculado pelo Probit.

Castillo et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes, com valores de CL_{50} de *M. anisopliae* variando entre 10^4 e 10^6 conídios/mL sobre adultos de *C. capitata*. A CL_{50} de *M. anisopliae* sobre adultos de *Anthonomus grandis* foi de $0,66 \times 10^6$ conídios/mL (ALMEIDA, 2005) e sobre larvas de *Delia radicum* foi de $2,7 \times 10^6$ conídios/g de solo (BRUCK et al., 2005). Esses dados evidenciam o potencial dessas linhagens, pois a estimativa da CL_{50} é um importante parâmetro para a seleção de patógenos (ALVES, 1998), visando aplicações mais adequadas e econômicas.

Pela análise de *Probit*, as linhagens testadas não se adequaram ao modelo para o cálculo do TL_{50} , por ter ocorrido um χ^2 significativo e uma elevada heterogeneidade dos dados. Em experimentos com organismos vivos, nem sempre se observa um modelo linear na relação estímulo/resposta, dificultando assim a análise por esse modelo. Este fato também foi constatado por Paz Júnior (2006) nos seus bioensaios de virulência de *B. bassiana* contra *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae). Deste modo, optou-se por uma análise de variância com teste de comparação das médias de mortalidade, em cada concentração, com regressão polinomial para determinar a equação de tempo/resposta das duas linhagens de *M. anisopliae* testadas.

O TL_{50} diminuiu à medida que a concentração fúngica foi aumentada, ficando entre o 5º e o 6º dia na concentração de 10^8 conídios/mL da linhagem *M. anisopliae* URM3349 (Figura 6). Porém, em *M. anisopliae* URM4403 este tempo foi verificado na concentração de 10^7 conídios/mL e a concentração mais elevada (10^8 conídios/mL) apresentou o menor tempo (4-5 dias) (Figura 7). Estes valores assemelham-se aos encontrados por Kaaya & Munyinyi (1995) e aos de Maniania (1998) onde o tempo letal médio de *M. anisopliae* sobre moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.) foi de quatro a seis dias. Em laboratório, valores de TL_{50} de *M. anisopliae* contra *C. capitata* e contra *C. rosa* variaram de 4,3-6,5 dias e de 4,7-5,7 dias respectivamente, sem diferença significativa para as duas espécies (DIMBI et al., 2003b).

Contudo, os valores de TL_{50} obtidos neste trabalho, contra *Z. indianus*, são menores que os de Tefera & Pringle (2003) contra larvas de *Chilo partellus* (7 a 19 dias) alimentadas com dieta artificial, sugerindo que a dieta continha substâncias antimicrobianas que inibiram a infecção pelo fungo. Moraga et al. (2004) também obtiveram valores elevados de TL_{50} de *M. anisopliae* contra baratas (14,8 dias) na concentração de 10^8 conídios/mL. Utilizando um produto comercial de *M. anisopliae* (Bioblast) para controlar cupins subterrâneos (*Coptotermes formosanus*), 50% dos insetos estavam mortos somente após 14 dias da aplicação (WRIGHT et al., 2005). Por outro lado,

formigas operárias (*Atta sexdens sexdens*) tratadas com um isolado de *M. anisopliae*, de Alagoas/BR, na concentração de 10^8 conídios/mL apresentaram um TL_{50} de 2,6 dias (LOUREIRO & MONTEIRO, 2004).

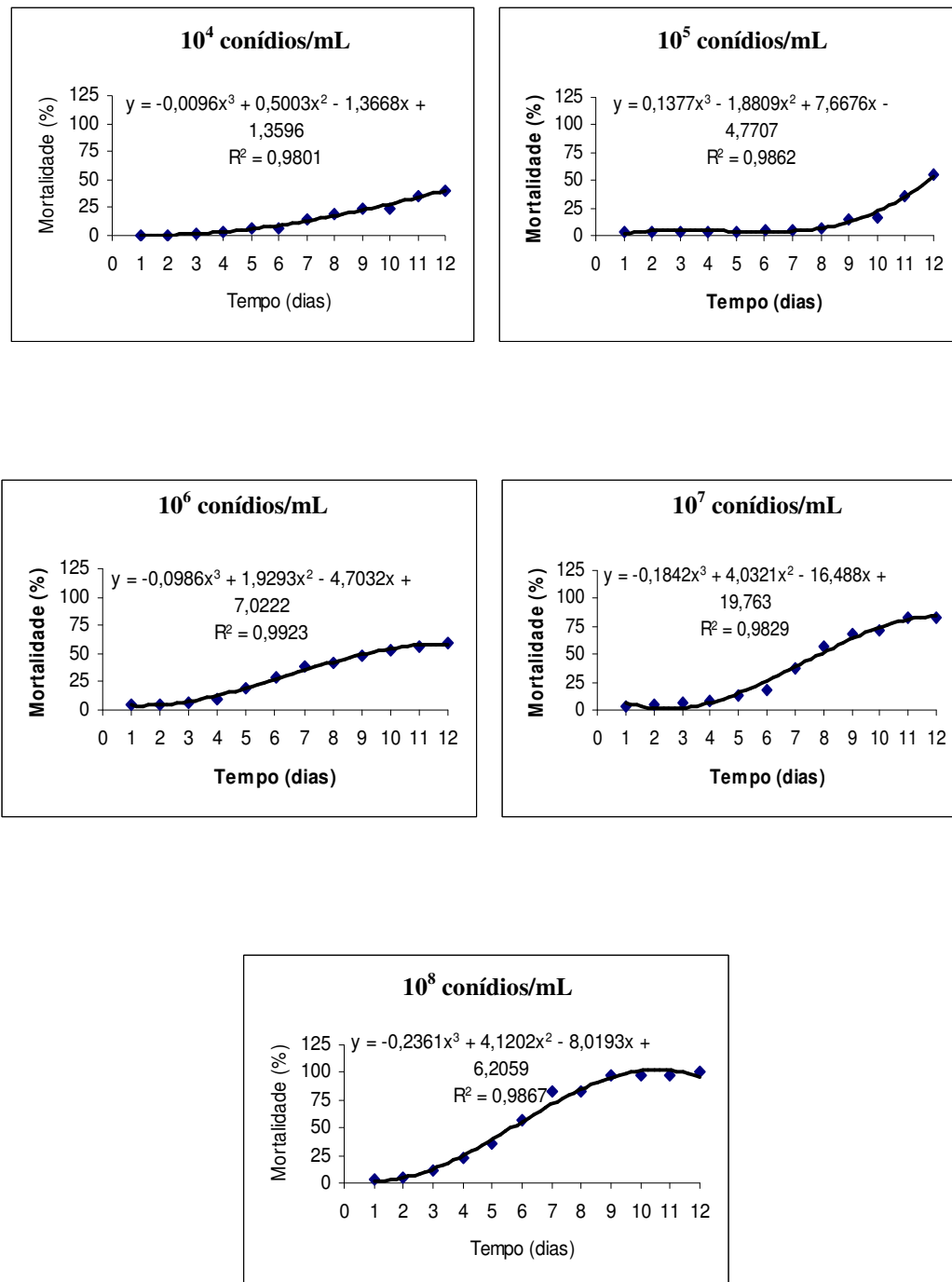


Figura 6. Percentual médio da mortalidade de adultos de *Zaprionus indianus* infectados com diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* URM3349.

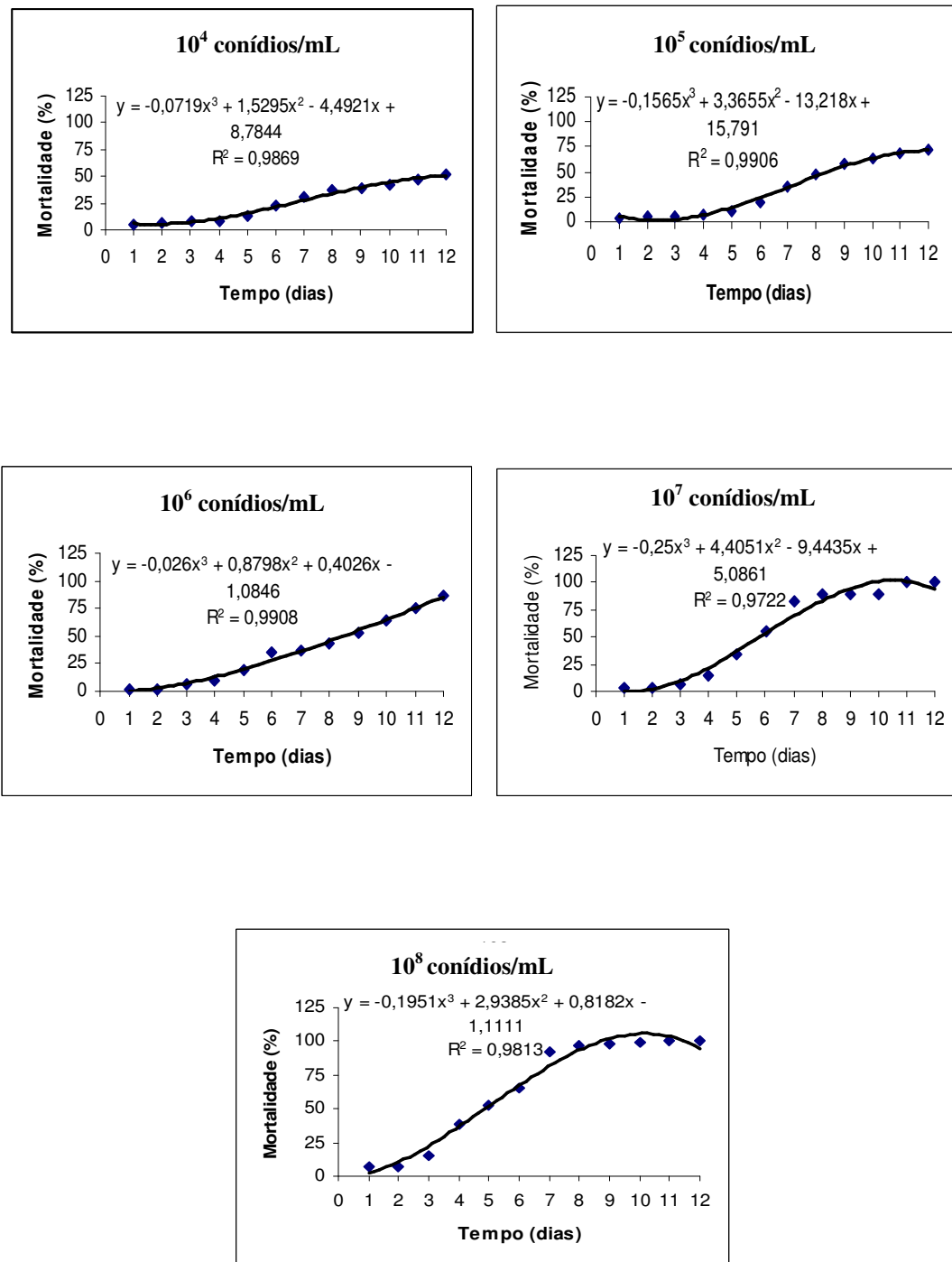


Figura 7. Percentual médio da mortalidade de adultos de *Zaprionus indianus* infectados com diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* URM4403.

A produção de conídios de *M. anisopliae* sobre adultos de *Z. indianus* mortos, após 10 dias, foi em média de $2,17 \times 10^7$ conídios/mL e de $1,99 \times 10^7$ conídios/mL para *M. anisopliae* URM3349 e para *M. anisopliae* URM4403, respectivamente (Tabela 7). Embora não tenha sido observada diferença significativa entre as linhagens utilizadas, estes resultados são relevantes, como os encontrados por Dimbi et al. (2003b), onde o número de conídios por mosca (*Ceratitis* spp.) foi aproximadamente 10^6 conídios/mL. Albuquerque et al. (2005), relataram que a esporulação de *M. anisopliae* sobre cupins (*Nasutitermes coxipoensis*) alcançou cerca de 10^4 conídios/mL.

Tabela 7. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 sobre cadáveres de *Zaprionus indianus* ($\times 10^7$ conídios/mL).

LINHAGEM	ESPORULAÇÃO
URM3349	2,1733 A ¹
URM4403	1,9920 A
CV (%) = 38,757	

¹ Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

Dados sobre a esporulação são importantes porque possibilitam estudos posteriores sobre disseminação de conídios fúngicos, onde insetos contaminados podem veicular a doença para outros insetos sadios da população. Esta técnica foi testada com cupins alados (*Coptotemes formosanus*), onde operários inoculados com *M. anisopliae* conseguiram infectar aproximadamente 60% dos companheiros do ninho, após 21 dias (WRIGHT et al., 2005).

Os resultados sobre a patogenicidade de *M. anisopliae* URM3349 e de *M. anisopliae* URM4403 à *Z. indianus* indicam o potencial destas linhagens para utilização em Programa de Controle Biológico contra essa mosca, porém estudos posteriores referentes a efeitos subletais, que possam afetar secundariamente a fecundidade e a fertilidade do inseto também são importantes para garantir sua eficiência, além de testes de campo. Face aos resultados obtidos *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 têm potencial para serem utilizadas em programa de Controle Biológico de *Zaprionus indianus*.

4.3 Aspectos morfológicos do reisolado

Após o reisolamento de *M. anisopliae* de adultos de *Z. indianus* foi analisado o comportamento do mesmo, em relação ao padrão (linhagem fúngica sem contato com o inseto). Em todos os dias de observação, houve diferença significativa entre *M. anisopliae* URM3349 (padrão) e seu reisolado, porém o crescimento de *M. anisopliae* URM4403 (padrão) e seu reisolado diferiram significativamente, apenas no 3º e no 15º dia de análise (Tabela 8). Além disso, comparando-se o crescimento entre as linhagens, a partir do 6º dia, foi notado que *M. anisopliae* URM4403 (padrão) apresentou crescimento superior a *M. anisopliae* URM3349 (padrão), porém os dois reisolados, a partir do 12º dia, tiveram crescimento semelhante, chegando ao máximo de 6,76 cm de diâmetro ao final do experimento.

Tabela 8. Diâmetro da colônia (cm) de *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 (padrão e reisolado) de *Zaprionus indianus*.

TEMPO (DIAS)		LINHAGEM	
		URM3349	URM4403
3	P ²	1,00 (A,a) ¹	1,04 (A,a) ¹
	R	1,57 (B,a)	1,35 (B,a)
6	P	1,86 (A,a)	2,52 (A,b)
	R	2,91 (B,b)	2,60 (A,a)
9	P	3,42 (A,a)	3,96 (A,b)
	R	4,33 (B,b)	4,00 (A,a)
12	P	4,14 (A,a)	5,14 (A,b)
	R	5,64 (B,a)	5,47 (A,a)
15	P	5,32 (A,a)	6,00 (A,b)
	R	6,55 (B,a)	6,76 (B,a)
CV (%) = 5,73			

¹ Média de cinco repetições Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

² P= padrão, R= reisolado

Ferreira (2000) observou que *M. anisopliae* apresentou crescimento máximo (7,90 cm) à temperatura de 28° C, em BDA_N, após 15 dias de experimento, porém neste trabalho, o fungo padrão alcançou, no máximo, 6,00 cm de diâmetro, indicando a variação comportamental existente entre as linhagens, como já foi observado anteriormente. Por outro lado, Nascimento (2003) não observou diferença entre o reisolado e seu padrão (*M. anisopliae*) no que se refere ao diâmetro da colônia. Além disso, os valores obtidos pelo autor foram menores (3,07 cm) do que os deste trabalho, aos 12 dias (5,14 cm). Porém, Feijó (2004) relatou que o diâmetro da colônia do reisolado foi maior do que o padrão, aos 15 dias. Do mesmo modo, Maciel et al. (2005) também constataram que o crescimento colonial de *B. bassiana* foi maior pós-passagem pelo inseto, demonstrando assim que ocorreu revigoramento fúngico.

Todas as colônias de *M. anisopliae* observadas apresentaram coloração esverdeada e aspecto pulverulento (Figura 8), características da espécie (LUNA-ALVES LIMA, 1985; FERREIRA, 2000). As estruturas vegetativas e reprodutivas presentes em *M. anisopliae* também foram analisadas, antes e após a passagem em *Z. indianus*, em períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. As estruturas vegetativas e reprodutivas dos reisolados não diferiram do padrão, conforme constatado por Nascimento (2003) e por Feijó (2004).

No primeiro dia de análise foi observado pouco crescimento micelial no fungo padrão e no reisolado; após 48 horas, estavam presentes abundantes apressórios (Figura 9), que são estruturas envolvidas no processo de fixação e infecção dos fungos entomopatogênicos (ALVES, 1998). No fungo padrão, os conidióforos foram observados a partir das 72 horas, porém, nos reisolados, a partir do segundo dia já eram observados conidióforos simples e às 72 horas, abundantes conidióforos ramificados e conídios cilíndricos (Figura 10), típicos da espécie (LUNA-ALVES LIMA, 1985; SILVA & LUNA-ALVES LIMA, 2002; SILVA, 2004). Também foram encontradas anastomoses de hifas (Figura 11), tanto no padrão quanto no reisolado, o que é importante para iniciar o ciclo parassexual, pelo estabelecimento do heterocário (AZEVEDO, 1998).

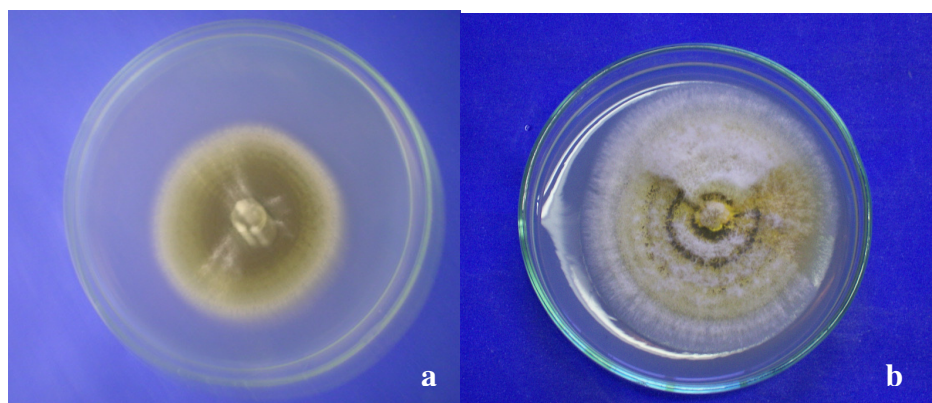


Figura 8. Colônias de *Metarhizium anisopliae* URM3349 (padrão) (a) e *Metarhizium anisopliae* URM4403 (padrão) (b), após 15 dias de crescimento em BDA, a 28° C.

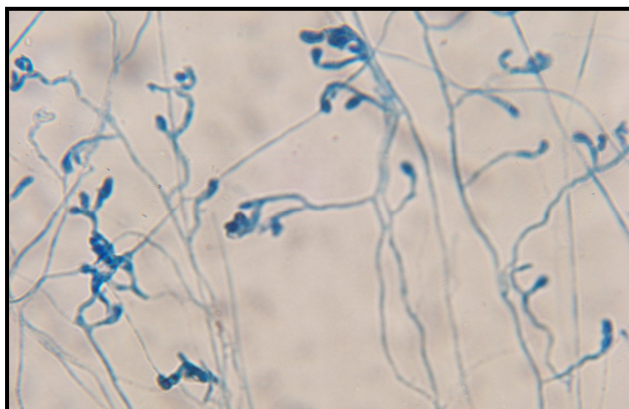


Figura 9. Apressórios de *Metarhizium anisopliae* URM3349, após 48 horas, em BDA, a 28° C (640X).

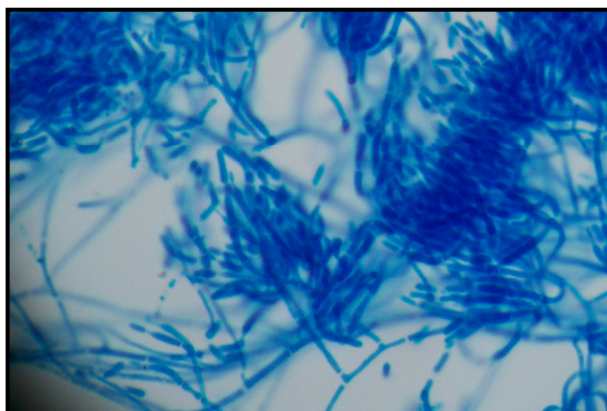


Figura 10. Conidióforos ramificados de *Metarhizium anisopliae* URM3349 reisolado de *Zaprionus indianus*, após 96 horas, em BDA, a 28° C (640X).

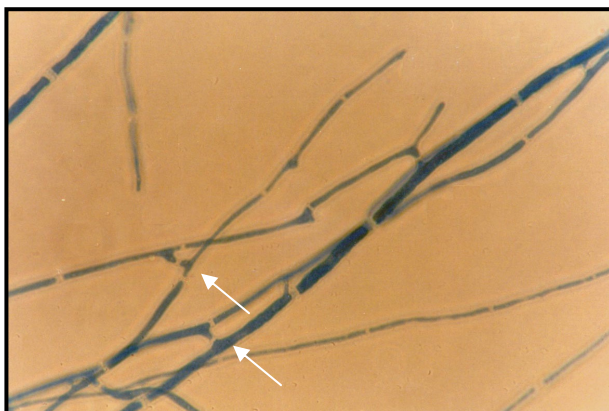


Figura 11. Anastomoses de hifas em *Metarhizium anisopliae* URM3349, após 48 horas, em BDA, a 28° C (640X).

5. CONCLUSÕES

- *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 não afetam o tempo de desenvolvimento das larvas de *Zaprionus indianus*, nas condições deste trabalho;
- *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 apresentam ação patogênica sobre larvas de *Zaprionus indianus*, diminuindo a emergência de adultos;
- *Metarhizium anisopliae* URM3349 e *Metarhizium anisopliae* URM4403 são infectivos a adultos de *Zaprionus indianus*, sendo que *Metarhizium anisopliae* URM4403 é o mais virulento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.C.; PEREIRA, K.C.A.; CUNHA, F.M.; VEIGA, A.S.F.L.; ATHAYDE, A.C.R.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.585-591, 2005.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLLACKWELL, M. Deuteromycetes - asexual Ascomycetes and other asexual fungi. In: ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed, Canadá: John Wiley & sons Inc., 1996, cap.8, p.214-257.

ALMEIDA, J.C. **Patogenicidade e viabilidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* ao *Anthonomus grandis* (Bohemian)**. 2005. 141f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.11, p. 289-381.

ALVES, S.B., MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.23, p.765-777.

ALVES, S.B., PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.27, p.845-869.

ARTHURS, S.; THOMAS, M.B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.59-65, 2001.

ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA, U.L.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.21, p.12-15, 2001.

AZEVEDO, J.L. **Genética de Microorganismos**. Goiânia: Editora da UFG, 1998, 477p.

AZEVEDO, J.L. O uso dos fungos na biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2000. Cap.3, p.93-152.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A.F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, p.107-113, 1994.

BRUCK, D.J.; SNELLING, J.E.; DREVES, A.J.; JARONSKI, S.T. Laboratory bioassays of entomopathogenic fungi for control of *Delia radicum* (L.) larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.179-183, 2005.

CAMPBELL, L.G.; BOETEL, M.A.; JONASON, N.B.; JARONSKI, S.T.; SMITH, L.J. Grower-adoptable formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) management. **Environmental Entomology**, v.35, p.986-991, 2006.

CAMPOS, S.R.S.L.C. **Fotomapa dos cromossomos politênicos e localização dos genes HSP70 e HSP83 de *Zaprionus indianus***. 2003. 44f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

CARNEIRO-LEÃO, M.P. **Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus indianus***. 2006. 59f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

CARNEIRO-LEÃO, M.P.; PESSOA, N.D.S.; BRASILEIRO, B.V.; VILA NOVA, M.X.; RIEGER, T.T.; SANTOS, J.F.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Caracterização molecular (PCR) e infecção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em *Zaprionus indianus*. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, XVII, 2006, Recife. **CD ROM**, Recife: SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA, 2006.

CASTILLO, M.A.; MOYA, P.; HERNÁNDEZ, E.; PRIMO-YÚFERA, E. Susceptibility of *Ceratitis capitata* wiedemann (Diptera: tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. **Biological Control**, v.19, p.274-282, 2000.

DARWISH, E.; ZAYED, A. Pathogenicity of two entomopathogenic hyphomycetes, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, to the housefly *Musca domestica*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.32, p.785-796, 2002.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Host species age and sex as factors affecting the susceptibility of the african tephritid fruit fly species, *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* and *C. fasciventris* to infection by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Pest Science**, v.76, p.113-117, 2003a.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; EKESI, S.; MUEKE, J.K. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* (Karsch) and *C. cosyra* (walker) (Diptera: Tephritidae). **Mycopathologia**, v.156, p.375-382, 2003b.

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

EKESI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.83, p.157-167, 2003.

EUCLYDES, R.F. **Manual de Utilização do Programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa: Minas Gerais, 1983, 59p.

FEIJÓ, F.M.C. **Ação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* no desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* sob condições de laboratório**. 2004. 126f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

FERREIRA, U.L. **Crescimento e condição nuclear de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* em meio de cultura e substratos naturais diferentes**. 2000. 68f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

FRANÇA, I.W.B.; MARQUES, E.J.; TORRES, J.B.; OLIVEIRA, J.V. Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.349-356, 2006.

GALEGO, L.G.C.; CARARETO, C.M.A. Intraspecific and interspecific pre-adult competition on the neotropical region colonizer *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) under laboratory conditions. **Bragantia**, v.64, p.249-255, 2005.

GAMS, W.; ROZSYPAL, J. *Metarhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and from soil. **Acta Botanica Neerlandica**, v.22, p.518-521, 1973.

GOMES, L.H.; ECHEVERRIGARAY, S.; CONTI, J.H.; LOURENÇO, M.V.M.; DUARTE, K.M.R. Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Dip.: Drosophilidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.5-7, 2003.

GUPTA, K.K.; GUPTA, J.P. Four new and two unrecorded species of Drosophilidae from Índia (Insecta: Diptera). **Proceedings of the Zoological Society**, v.44, p.119-126, 1970.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, p.261-266, 1999.

KAAYA, G.P.; MUNYINYI, D.M. Biocontrol potencial of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.66, p.237-241, 1995.

KARAN, D.; DUBEY, S.; MORETEAU, B.; PARKASH, R. DAVID, J.R. Geographical clines for quantitative traits in natural populations of a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. **Genetica**, v.108, p.91-100, 2000.

KATO, C.M.; FOUREAUX, L.V.; CÉSAR, R.A.; TORRES, M.P. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.454-455, 2004.

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. 2 ed. Ontario: Focus Texts, 1992, 406p.

LIU, Z.Y.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.S.; YAO, Y.J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.178-182, 2001.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.35-40, 2004.

LOUREIRO, E.S.; MOINO JR., A. Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.660-665, 2006.

LUNA-ALVES LIMA, E.A. **Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** 1985. 260f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia, Modalidade Genética) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.

MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S. Ecologia: *habitat* e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 2004. Cap.13, p. 451-490.

MACIEL, M.V.; LUNA-ALVES LIMA, E.A.; ALVES, N.D.; FEIJÓ, F.M.C. Ação de *Beauveria bassiana* no desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) em laboratório. **Caatinga**, v.18, p.1-5, 2005.

MAGALHÃES, B.P.; GOETTEL, M.S.; FRAZÃO, H.S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.162-164, 2000.

MANIANIA, N.K. A device for infecting adult tsetse flies, *Glossina* spp., with an entomopathogenic fungus in the field. **Biological Control**, v.11, p.248-254, 1998.

MARCHIORI, C.H.; SILVA, C.G. First occurrence of parasitoid *spalangia endius* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) in pupae of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.63, p.361-362, 2003.

MARCHIORI, C.H.; ARANTES, S.B.; PEREIRA, L.A.; SILVA-FILHO, O.M.; RIBEIRO, L.C.S.; BORGES, V.R. Parasitoids of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) collected in Itumbiara, Goiás, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.197-198, 2003a.

MARCHIORI, C.H.; ARANTES, S.B.; PEREIRA, L.A.; SILVA-FILHO, O.M.; RIBEIRO, L.C.S.; BORGES, V.R. Primeiro registro de *Leptopilina boulandi* Bartbotin et al. (Hymenoptera: Figitidae: Eucoilinae) parasitando *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) no Brasil. **Ciências Agrárias**, v.24, p.321-324, 2003b.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B. Otimização de formulações na preservação de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v.39, p.861-877, 1996.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B.; MARQUES, I.M.R. Effects of the temperature and storage on formulations with mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, p.153-160, 1999.

MENDONÇA, A.F. **Cigarrinhas da Cana-de-Açúcar: Controle Biológico**. Maceió:Insecta, 2005. 317p.

MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transaction British Mycological Society**. v.75, p.473-477, 1980.

MORAGA, E.Q.; QUIRÓS, R.S.; GARCÍA, P.V.; ÁLVAREZ, C.S. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the german cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.87, p.51-58, 2004.

NASCIMENTO, F.S.B. **Ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* e parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephalus sanguineus***. 2003. 57f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

OUEDRAOGO, R.M.; CUSSON, M.; GOETTEL, M.S.; BRODEUR, J. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.103-109, 2003.

PACCOLA-MEIRELLES L.D.; AZEVEDO J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.172-176, 1991.

PAZ JÚNIOR, F.B. Ação patogênica de linhagens de *Beauveria bassiana* sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), análise genética (PCR) e compatibilidade com inseticidas químicos. 2006. 96f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

POINAR JR, G.; POINAR, R. Fossil evidence of insect pathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.243-250, 2005.

RAGA, A.; SOUZA-FILHO, M.F. Captura de *Zaprionus indianus* (Gupta) (Dip.: Drosophilidae) em frascos plásticos com iscas alimentares na cultura do figo. **Revista Agricultura**, v.78, p.323-329, 2003.

RAGA, A.; SOUZA-FILHO, M.F.; SATO, M.E. eficiência de protetores de ostíolo do figo sobre a infestação da mosca *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) no campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.287-289, 2003.

RODDAM, L.F.; RATH, A.C. Isolation and Characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie island. **Journal of Ivertebrate Pathology**, v.69, p.285-288, 1997.

ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; ROBERTS, D.W. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon islands. **Mycotaxon**, v.27, p.87-92, 1986.

SANTOS, J.F.; RIEGER, T.T.; CAMPOS, S.R.C.; NASCIMENTO, A.C.C.; FÉLIX, P.T.; SILVA, S.V.O.; FREITAS, F.M.R. Colonization of northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for brazilian fruitculture. **Drosophila Information Service**, v.86, p.92-95, 2003.

SCHOLTE, E.J.; KNOLS, B.G.J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.91, p.43-49, 2006.

SETTA, N.; CARARETO, C.M.A. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. **Iheringia**, v.95, p.47-51, 2005.

SILVA, A.P.A.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Aspecto citológico de *Metarhizium anisopliae* isolado de *Mahanarva posticata*. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA- ITEP 60 ANOS, 6, 2002, Recife. **Anais...** Recife: FACEPE, 2002. p.173.

SILVA, A.P.A. **Análise citomorfológica e enzimática de *Metarhizium anisopliae* e de *Beauveria bassiana* resistentes à luz ultravioleta**. 2004. 38f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SILVA, C.G.; COSTA, R.I.F.; MARCHIORI, C.H.; TORRES, L.C.; AMARAL, B.B. Ocorrência de *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani, 1875) (Hym.:Pteromalidae) em pupas de *Zaprionus indianus* Gupta (Dip.: Drosophilidae) coletados em frutos de goiaba. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.91-92, 2004.

SILVA, N.M.; FANTINEL, C.C.; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in Communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. **Neotropical Entomology**, v.34, p.363-374, 2005.

STEIN, C.P.; TEIXIRA, E.P.; NOVO, J.P.S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Entomotropica**, v.18, p.219-221, 2003.

STEIN, C.P.; TEIXIRA, E.P.; NOVO, J.P.S. **Mosca do figo - *Zaprionus indianus***. (2003). Disponível em: [http:// www.iac.br/~centif/artigos/zaprionus](http://www.iac.br/~centif/artigos/zaprionus). Acesso em: 10 maio 2005.

ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambiente pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.4, p.709-713, 1998.

TEFERA, T.; PRINGLE, K.L. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.84, p.220-225, 2003.

TIDON, R.; LEITE, D.F.; LEÃO, B.F.D. Impact of the colonisation of *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae) in different ecosystems of the neotropical region: 2 years after the invasion. **Biological Conservation**, v.112, p.299-305, 2003.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions British Mycological Society**, v.66, p.407-411, 1976.

VAN DER LINDE, K. ***Zaprionus indianus***: taxonomic and species identification (2005). Disponível em: <http://www.kimvdlinde.com/professional/index.html>. Acesso em: 01 ago. 2005.

VAN DER LINDE, K.; STECK, G.J.; HIBBARD, K.; BIRDSLEY, J.S.; ALONSO, L.M.; HOULE, D. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. **Florida Entomologist**, v.89, p.402-404, 2006.

VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v.39, p.123-128, 1996.

VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the neotropical region? **Drosophila Information Service**, v.82, p.37-39, 1999.

VILELA, C.R.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. Mosca africana do figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: Vilela, C.R.(Ed.). **Histórico e Impacto das Pragas Introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap.7, p.48-52.

WHEELER, M.R. Additions to the catalog of the world's Drosophilidae. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H.L.; THOMPSON, J.N. (Eds). **The Genetics and Biology of *Drosophila***, 3 ed. London: Academic Press, 1986. p.395-409.

WRIGHT, M.S.; RAINA, A.K.; LAX, A.R. A strain of the fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling subterranean termites. **Journal of Economic Entomology**, v.98, p.1451-1458, 2005.