

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

ELYS REGINA CARVALHO ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E
CONTROLE DA MOSCA NEGRA DOS CITROS
(Aleurocanthus woglumi Ashby, 1903)

São Luís
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E
CONTROLE DA MOSCA NEGRA DOS CITROS
(Aleurocanthus woglumi Ashby, 1903)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do Título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Santos de Lemos.

São Luís
2015

Rocha, Elys Regina Carvalho.

Caracterização de fungos entomopatogênicos e controle da Mosca Negra dos citros (*Aleurocanthus wlogumi* Ashby, 1908) / Elys Regina Carvalho Rocha.–São Luís, 2015.

53 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Profa. Raimunda Nonata Santos de Lemos.

1.*Aschersonia aleyrodis*. 2.Controle microbiano. 3.Praga de citros.
I.Título.

CDU: 634.3-29

Dedico a minha família,
em especial aos meus pais,
por recarregarem minhas forças a cada dia.

E ao meu avôzinho (*in memoriam*), que sempre estará presente a cada toque de flauta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida e por não me esquecer nem por um segundo, sempre colocando as pessoas certas em meu caminho.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais, Carlos e Zenaide que sempre nos guiaram pelos caminhos mais belos, por eles tenho eterno orgulho e por eles reúno forças para continuar esta trajetória, agradeço pelo apoio, compreensão e, em especial, por todo amor ao longo deste percurso. Não esquecendo a companhia insubstituível em inúmeras coletas e avaliações.

Aos meus irmãos Carlos Alberto, Héliida Maria, Hellen Cristina e Warmiston pela valiosa troca de conhecimentos, pelo orgulho e amor devotados a mim.

Ao meu Namorado e Amigo, Alex Viana, agradeço pela ajuda incondicional, pelo companheirismo, pela paciência, por ter o dom de sempre me colocar pra cima e me fazer acreditar que tudo que desejo acontecerá.

À minha orientadora Profa. Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos e a Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues pela oportunidade de desenvolver em conjunto esta pesquisa, pela valiosa troca de conhecimentos e empenho inesgotável para realização deste trabalho. As duas são o mais perfeito exemplo de profissionais, mães e mulheres que com certeza levarei por toda a vida.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia Elizabeth, Érica, Erlen, Gustavo, Leandro Victor, Leonardo, Nathália Nicolle, Rodrigo Aguiar, Keneson agradeço por transformarem coletas e trabalhos exaustivos em momentos alegres e de companheirismo.

Ao meu amigo Leonardo de Jesus, em especial, agradeço por todos os ensinamentos compartilhados, pelos momentos vividos em laboratório e por ter me acompanhado todo esse percurso da graduação até o mestrado. Sua participação foi fundamental para realização deste trabalho. Obrigada!

Ao Dr. Angelo Luiz Tadeu Ottati e amigo Luís Gustavo pelas análises estatísticas.

“Cuide, cultive, queira o bem. O resto vem!”

Caio Fernando Abreu

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Postura em forma de espiral (A); Adulto recém-emergido de uma abertura em forma de "T" invertido na parte anterior da pupa (B); Adulto após emergência com cabeça amarelada, tórax e abdome de coloração alaranjada (C); Adultos após 24h da emergência com coloração do corpo cinza-escuro (D).....17
- FIGURA 2 - Estádios ninfaís de mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi*. A) 1º ínstar; B) 2º ínstar; C) 3º ínstar e D) 4º ínstar ou "pupa".18
- FIGURA 3 - A) Colônias de *A. aleyrodis* associadas à mosca negra dos citros no campo; B) Aspecto aos dez dias de incubação e C) Conídios de isolado *A. aleyrodis*.....28
- FIGURA 4 - A) Colônias de *Isaria* sp. associadas à mosca negra dos citros no campo; B) Aspecto aos dez dias de incubação e C) Conídios de isolados *Isaria* sp.....29
- FIGURA 5 - A) Aspecto da colônia de *B. bassiana* aos dez dias de incubação ($26 \pm 1^\circ$ C e fotofase de 12 h); B) Conídios de isolados *B. bassiana* provenientes da Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" do Laboratório de Fitopatologia da UEMA..... 30
- FIGURA 6 - A) Aspecto da colônia de *M. anisopliae* aos dez dias de incubação ($26 \pm 1^\circ$ C e fotofase de 12 h); B) Conídios de isolados *M. anisopliae* provenientes da Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" do Laboratório de Fitopatologia da UEMA..... 30
- FIGURA 7- Mortalidade total, Mortalidade corrigida e Mortalidade confirmada após 10 dias da pulverização na concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹ dos fungos *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Isaria* sp. e *Metarhizium anisopliae*.....31
- FIGURA 8 - Mortalidade confirmada da ninfa de 3º instar de mosca negra pelo fungo *A. aleyrodis*.....33
- ..
- FIGURA 9 - Mortalidade total, Mortalidade corrigida e Mortalidade confirmada após 10 dias da pulverização em diferentes concentrações do fungo *Aschersonia aleyrodis*.....40
- FIGURA 10 - Mortalidade total, Mortalidade corrigida e Mortalidade confirmada após 10 dias da pulverização em diferentes concentrações do fungo *Isaria* sp.....41
- FIGURA 11 - Mortalidade de mosca negra dos citros 10 dias após a aplicação do isolado *Aschersonia aleyrodis* nas concentrações testadas.....41
- FIGURA 12 - Mortalidade de mosca negra dos citros 10 dias após a aplicação do isolado *Isaria* sp nas concentrações testadas.....42
- FIGURA 13 - Análise de sobrevivência de ninfas de *Aleurocanthus woglumi* tratados com os fungos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. em diferentes concentrações avaliados por 10 dias.....43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Taxa de mortalidade (%) de ninfas de <i>Aleurocanthus woglumi</i> submetidos a diferentes tratamentos 10 dias após, São Luís – MA.....	33
TABELA 2 - Crescimento, Esporulação e Germinação de conídios dos fungos <i>Aschersonia aleyrodis</i> e <i>Isaria</i> sp. comparados em três diferentes tipos de meios de cultura, São Luís – MA.....	36
TABELA 3 - Mortalidade confirmada (%) pelos fungos entomopatogênicos <i>Aschersonia aleyrodis</i> e <i>Isaria</i> sp. em diferentes concentrações, após o 10º dia de avaliação, São Luís – MA.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Citricultura Brasileira	13
2.2 <i>Aleurocanthus woglumi</i> Ashby, 1903.....	15
2.3 Manejo de <i>Aleurocanthus woglumi</i>	18
2.3.1 Controle Biológico de <i>Aleurocanthus woglumi</i>	20
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Coleta e manutenção das ninfas de <i>Aleurocanthus woglumi</i>	23
3.2 Obtenção dos isolados de fungos entomopatogênicos.....	23
3.3 Preparo das suspensões de conídios	24
3.4 Avaliação da eficiência dos fungos entomopatogênicos no controle da mosca negra dos citros	24
3.5 Avaliação de diferentes meios de cultura no crescimento micelial, esporulação e germinação de fungos entomopatogênicos	25
3.6 Determinação da Concentração Mediana Letal (CL ₅₀) e Tempo Mediano Letal (TL ₅₀) dos fungos entomopatogênicos em ninfas de <i>A. woglumi</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Características morfológicas dos fungos entomopatogênicos	28
4.2 Avaliação da eficiência dos fungos entomopatogênicos no controle da mosca negra dos citros	31
4.3 Avaliação de diferentes meios de cultura no crescimento micelial, esporulação e germinação de fungos entomopatogênicos	35
4.4 Determinação da Concentração Mediana Letal (CL ₅₀) e Tempo Mediano Letal (TL ₅₀) dos fungos entomopatogênicos em ninfas de <i>A. woglumi</i>	38
5 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

Atualmente a citricultura vem sendo ameaçada pela mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), originária da Ásia, sendo considerada de importância agrícola em vários países. Objetivou-se estudar as características morfológicas e a eficiência de *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria* sp. no controle da mosca negra dos citros avaliando-se o crescimento, esporulação e germinação dos fungos em diversos meios de cultura e determinando-se a Concentração Mediana Letal (CL₅₀) e Tempo Mediano Letal (TL₅₀) dos fungos entomopatogênicos sobre *A. woglumi*. Folhas de citros contendo 30 ninfas de mosca negra cada, foram pulverizadas com quatro espécies de fungos na concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ e água destilada. O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 6 repetições. As avaliações foram realizadas por 10 dias consecutivos após a aplicação dos fungos. Após determinação dos fungos mais promissores no controle da praga, o crescimento vegetativo, esporulação e germinação destes foram comparados em três diferentes tipos de meio (Completo, BDA e BDA sintético). Para determinação de TL₅₀ e CL₅₀ foram utilizadas seis concentrações (5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹) e água destilada. O delineamento foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 5 repetições. As avaliações foram realizadas por dez dias consecutivos após a aplicação dos tratamentos. *A. aleyrodis* foi mais eficiente na concentração 1×10^7 conídios.mL⁻¹ ocasionando 85 % de mortalidade. Os fungos obtiveram melhor desenvolvimento quando produzidos em meio completo apresentando maior crescimento micelial, produção e germinação de conídios. O fungo *A. aleyrodis* mostrou-se patogênico às ninfas em todas as concentrações avaliadas. Enquanto que *Isaria* sp. apresentou a maior mortalidade nas concentrações de 5×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹, ambas ocasionando 61,3 % de controle. Em relação ao TL₅₀, os valores médios de sobrevivência não foram diferentes para os fungos testados, seguindo um mesmo padrão, sendo que para *A. aleyrodis* o tempo mediano foi de 2 dias e para *Isaria* sp. 3 dias, evidenciando a eficiência destes fungos no controle biológico de ninfas de *A. woglumi* como uma alternativa de controle.

Palavras-chave: *Aschersonia aleyrodis*, controle microbiano, praga dos citros.

ABSTRACT

Currently, the citrus industry is being threatened by the black fly citrus, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), originally from Asia, is considered of agricultural importance in several countries. The objective was to study the morphology and *Aschersonia aleyrodis* efficiency, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria* sp. in controlling the black fly citrus evaluating the growth, sporulation and germination of fungi in various culture media and determining the concentration median lethal (LC₅₀) and Time Average Lethal (LT₅₀) of entomopathogenic fungi on *A. woglumi*. Leaves of citrus blackfly containing 30 nymphs each were pulverized with four species of fungi at concentration of 1×10^7 conídios.mL⁻¹ and distilled water. The design was completely randomized with 5 treatments and 6 repetitions. The evaluations were performed for 10 consecutive days after application of fungi. After determining the most promising fungi to control the pest, vegetative growth, sporulation and germination of these were compared in three different types of medium (Complete synthetic PDA and PDA). To determine LC₅₀ and LT₅₀ six concentrations were used (5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 and 1×10^8 conídios.mL⁻¹) and distilled water. The design was completely randomized with seven treatments and five repetitions. The evaluations were performed for ten consecutive days after treatment application. *A. aleyrodis* was more efficient at a concentration of 1×10^7 conídios.mL⁻¹ causing 85 % mortality. Fungi had better development when produced in complete medium having greater mycelial growth, production and spore germination. The fungus *A. aleyrodis* proved to be pathogenic to nymphs in all evaluated concentrations. While *Isaria* sp. had the highest mortality at concentrations of 5×10^7 and 1×10^8 conídios.mL⁻¹, both resulting in 61.3 % of control. Regarding TL₅₀, the average survival values were not different for the fungi tested, following the same pattern and for *A. aleyrodis* the median time was 2 days and *Isaria* sp. 3 days, showing the efficiency of these fungi in the biological control of *A. woglumi* nymphs as a control alternative.

Keywords: *Aschersonia aleyrodis*, microbial control, citrus pest.

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais relevantes agroindústrias brasileiras, sendo responsável por 90 % da produção mundial de suco de laranja e também a campeã de exportações do produto (FAO, 2012). São colhidas, anualmente no País, mais de 18 milhões de toneladas de laranja ou cerca de 30 % da safra mundial da fruta (MAPA, 2011). Sendo que a região Sudeste é responsável por 81,8 % da produção do país.

O Nordeste representa apenas 9,8 % desta produção e o Maranhão em 2012 contribuiu com apenas 6.713 toneladas da fruta (IBGE, 2013). Destacando-se seis municípios com maior área plantada de citros Codó (30 ha), São Domingos do Maranhão (25 ha), Vitória do Mearim (24 ha), Mirador (20 ha), São Luís Gonzaga do Maranhão (20 ha) e Estreito (20 ha) (IBGE, 2012).

Estima-se que os altos custos de produção de citros estão diretamente ligados a constante utilização de defensivos agrícolas em função da elevada sensibilidade da cultura com a incidência crescente de doenças e pragas (AGRIANUAL, 2013). Aproximadamente 6 % do total de agrotóxicos consumidos no Brasil são atribuídos ao controle de pragas e doenças na citricultura (NEVES, 2010).

Atualmente, a citricultura brasileira vem sendo ameaçada pela mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), uma praga originária da Ásia, sendo considerada praga de importância agrícola em vários países devido ao prejuízo econômico que ocasiona (BARBOSA; PARANHOS, 2004). No Brasil, outrora tratada como praga quarentenária A₂, hoje trata-se de uma praga amplamente difundida no país (MAPA, 2014).

A rapidez com que a mosca negra dos citros se disseminava no país, aliada a escassez de pesquisas em relação à dinâmica da praga e métodos de controle, em 2008, três grupos químicos foram registrados para efetuar seu controle, um Piretróide e Antranilamida, altamente tóxico e altamente perigoso ao meio ambiente e dois Neonicotinóides, medianamente tóxicos e perigosos ao meio ambiente (AGROFIT, 2014).

Diante dos problemas ocasionados pela intensiva utilização dos químicos sintéticos, o controle biológico surge como uma alternativa viável para o controle de pragas, apresentando vantagens em relação aos químicos, especialmente quanto à supressão de impacto ambiental,

custo, especificidade e ao desenvolvimento de resistência, principalmente para a mosca negra dos citros. Em diversas partes do mundo o controle biológico da mosca negra tem se mostrado mais eficiente que o controle químico, sendo realizado por meio de parasitóides, predadores e fungos entomopatogênicos (OLIVEIRA et al., 2001a).

Os fungos entomopatogênicos tem recebido maior interesse em pesquisas, tendo em vista que praticamente todas as ordens de insetos-pragas são susceptíveis ao ataque de fungos parasitas, sendo estes amplamente utilizados em programas de controle biológico de pragas em diversas culturas de importância econômica. No Brasil, as espécies de fungos mais importantes utilizadas no controle biológico são pertencentes aos gêneros *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Nomuraea rileyi* Farlow, *Entomophora*, *Aschersonia*, *Verticilium lecanii* e *Cladosporium* spp. (ALVES et al., 2008).

Devido ao uso indiscriminado de produtos químicos, aliado ao atual interesse da sociedade pela preservação ambiental e desenvolvimento sustentável este trabalho objetivou estudar as características morfológicas e a eficiência de *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria* sp. no controle da mosca negra dos citros avaliando-se o crescimento, esporulação e germinação dos fungos em diversos meios de cultura e determinando-se a Concentração Mediana Letal (CL₅₀) e Tempo Mediano Letal (TL₅₀) dos fungos entomopatogênicos sobre *A. woglumi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citricultura Brasileira

Os citros são originários das regiões tropicais e subtropicais do Continente Asiático e no Arquipélago Malaio. Seus principais gêneros descritos são: *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*, dos quais somente os três primeiros apresentam maior interesse comercial, sendo *Citrus* o de importância mais relevante. A esse gênero relacionam-se as laranjas doces *C. sinensis* (L.) Osb., tangerinas (diversas espécies), laranjas azedas *C. aurantium* L., pomelos *C. paradisi* Macf., toranjas *C. grandis* Osb., limas ácidas *C. aurantifolia* Swing., limas doces *C. limettioides* Tan., limões *C. limon* Burm., cidras *C. medica* L. e outros tipos, incluindo híbridos naturais (CHAPOT, 1975; SIMÃO, 1998).

As plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente no estado da Bahia. Entretanto, com melhores condições para

vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, a citricultura se expandiu para todo o país. Cultura esta que vêm se destacando pela promoção do crescimento sócio-econômico, elevando valores no cenário econômico mundial e principalmente, como matriz geradora de empregos diretos e indiretos em regiões rurais (ALVES; MELO, 2013).

Atualmente o Brasil é considerado um dos maiores produtores e exportadores de produtos cítricos do mundo. Apresentando números expressivos que traduzem grande importância econômica e social que esta atividade tem para a economia do País. A área plantada total está em torno de 817.292 hectares e a produção de frutas supera 19 milhões de toneladas, a maior no mundo há vários anos, sendo São Paulo responsável por 15.293.506 de toneladas (IBGE, 2013).

São cultivadas frutas cítricas em 22 dos 27 estados brasileiros e cerca de 99,0 % da laranja total produzida é originada de sete estados: São Paulo (77,2 %), Bahia (5,2 %), Sergipe (4,2 %), Minas Gerais (4,2 %), Paraná (4,0 %), Rio Grande do Sul (2,0 %) e Pará (2,0 %), situados nas regiões Sudeste, Nordeste, Sul e Norte (AZEVEDO, 2013).

Sendo o estado de São Paulo a principal região produtora correspondendo a 80 % da produção nacional (IBGE, 2013). A citricultura paulista tem completo domínio das indústrias de sucos cítricos, detendo um total de 36 % dos pomares cultivados no país, o que reforça a participação desta na composição do preço final da fruta. Com o passar dos anos a cidade de São Paulo, maior produtor do país, deteve uma crescente concentração da produção de laranjas nas mãos da indústria, haja vista que esta, em 2002, contribuiu com 10 milhões de caixas de laranja, passando, em 2012, a produzir 130 milhões de caixas com tendência de aumento (DIÁRIO *ON LINE*, 2014).

O Nordeste aparece no *Ranking* como a segunda maior região produtora de citros no Brasil, apresentando grandes expectativas e potencial para a atividade citrícola. Tendo participação de apenas 9,8 % da produção brasileira de laranjas doces segundo as diversas regiões geográficas. A pequena participação da região nos totais nacionais refletem os crescentes custos de produção devido principalmente aos aumentos dos custos da mão-de-obra e do manejo de pragas e doenças que consistem em preocupações inerentes da prática (IBGE, 2013).

Um pomar cítrico, por ser formado de plantas perenes, se constitui num ambiente ideal para propagação de doenças e proliferação de insetos. As pragas dos citros são fatores limitantes à produção, ocorrendo desde a formação das mudas até a implantação e condução do pomar e pode comprometer seu desenvolvimento e sua produtividade total ou até mesmo inviabilizar economicamente a cultura (ALVES; MELO, 2013).

Dentre as pragas que limitam a produção e produtividade dos pomares de citros, destaca-se a mosca negra que encontra-se instalada em vários estados brasileiros. Em locais onde ocorre esta praga, as perdas de produtividade podem variar de 20 a 80% na produção, afetando assim a produção agrícola e as exportações, não apenas de plantas cítricas como de outras fruteiras que também são hospedeiras da praga (OLIVEIRA et al., 2001b).

2.2 *Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1903

A mosca negra dos citros é uma praga que se encontra amplamente difundida em todo o mundo, originária do sudeste Asiático sua ocorrência foi constatada em regiões tropicais e subtropicais da África, na Índia Ocidental, nas Américas Central, do Norte, do Sul (HEU; NAGAMINE, 2001) e na Oceania (COSAVE, 1999).

No Brasil foi relatada sua primeira ocorrência no estado do Pará, em 16 de maio de 2001, em Belém. O Maranhão foi o segundo estado brasileiro a relatar a presença da praga, em 15 de setembro de 2003, nos municípios de Boa Vista do Gurupi, Imperatriz e Bacabal (LEMOS et al., 2006). Sua presença foi confirmada nos estados do Amapá (JORDÃO; SILVA, 2006), Amazonas (PENA; SILVA, 2007), Tocantins e Goiás (MAPA, 2009). No estado de São Paulo teve o primeiro relato de sua ocorrência em 10 de março de 2008 (PENA et al., 2008). Na Paraíba, o inseto foi detectado pela primeira vez em 20 de dezembro de 2009 (LOPES et al., 2010). Em abril de 2010 foi constatada a presença da mosca negra dos citros em seis municípios do estado de Pernambuco (MONTEIRO et al., 2012). Em setembro de 2011 foi detectada em Roraima (CORREIA et al., 2011).

Em 29 de abril de 2008 de acordo com a instrução normativa nº 23, a mosca negra dos citros foi considerada uma praga quarentenária presente (A_2), sendo caracterizada como uma praga de importância econômica em potencial, já presente no país, porém não amplamente distribuída, possuindo programa oficial de controle. Onde constam as principais restrições

impostas para o transporte e comercialização de produtos oriundos e/ou espécies hospedeiras de Unidades da Federação onde seja constatada (MAPA, 2009).

Em 2014, a mosca negra deixa de integrar a lista de pragas quarentenárias presentes no país. A decisão foi publicada em 10 de dezembro de 2014 no Diário Oficial da União (DOU), por meio da Instrução Normativa nº 42 assinada por Neri Geller, ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Por se tratar atualmente de uma praga amplamente disseminada no Brasil (MAPA, 2014).

A mosca negra dos citros (*A.woglumi*) pertence à Ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha, família Aleyrodidae, subfamília Aleyrodinae. Pertence ao gênero *Aleurocanthus* (NGUYEN; HAMON, 2003; GALLO et al., 2002).

Segundo Angeles et al., (1972) trata-se de uma praga de hábito alimentar polífago, infestando diferentes espécies de plantas como *Parsea Americana* L. (abacateiro), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Coffea arabica* L. (cafeeiro), *Vitis vinifera* L. (videira), *Litchi chinensis* Sonn (licheira), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Carica papaya* L. (mamoeiro), *Pyrus communis* L. (pereira), *Rosa* sp. (roseira), além de infestar plantas daninhas e ornamentais. São relatadas diversas espécies de plantas hospedeiras desta praga, porém as plantas cítricas são consideradas as hospedeiras mais apropriadas para a realização das posturas (NGUYEN; HAMON, 2003; LOPES et al., 2013).

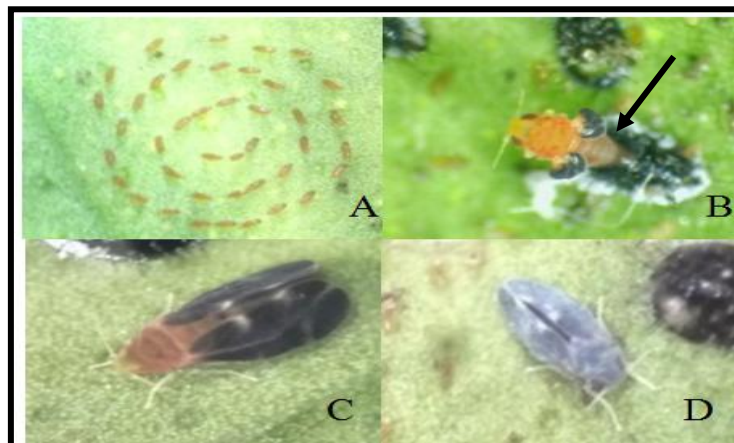
Todas as fases de desenvolvimento da mosca negra dos citros causam grandes danos às plantas por se alimentarem de sua seiva, deixando as plantas debilitadas, levando-as ao murchamento e em casos de grande infestação, à morte (OLIVEIRA et al., 2001b). Os danos ocasionados por esta praga podem ser definidos como diretos e indiretos. Os diretos são causados por ninfas e adultos no momento que se alimentam pela sucção contínua da seiva. O dano indireto é aquele decorrente do aparecimento de fumagina sobre as folhas, provocado pelo crescimento de fungos sobre o exsudato da praga, fato que dificulta tanto a transpiração, quanto a respiração e fotossíntese dos hospedeiros (RAGA; COSTA, 2008).

Os aleirodídeos são pequenos e possuem quatro asas membranosas cobertas com substância pulverulenta. Os ovos são pedunculados e ficam, como as ninfas, presos a face abaxial das folhas, podendo ser cobertos, ou não, por uma proteção de cera branca. Estes

insetos se desenvolvem em um curto período de tempo apresentando quatro ecdises ao longo de seu ciclo (GALLO et al., 2002).

Os adultos possuem asas e se alimentam por sucção, após sua emergência, os adultos apresentam cabeça amarelada, com tórax e abdome de coloração alaranjada. Após 24 hs, os adultos adquirem coloração do corpo cinza-escuro, por isso chamada popularmente de mosca negra. As fêmeas de *A. woglumi* medem cerca de 1,2 mm e o macho, 0,8 mm. As fêmeas sempre ovipositam na parte abaxial das folhas jovens e a postura apresenta-se em forma de espiral, com uma média de 35 a 50 ovos por postura. As fêmeas põem uma média de 100 ovos durante todo o ciclo de vida. Os ovos são alongados de forma elíptica, de coloração branco-cremosa. As ninfas são escuras e achatadas, de coloração negra brilhante e cerdas cerosas esbranquiçadas marginais (Figura 1) (LOPES et al., 2009; RAGA; COSTA, 2008).

Figura 1. Postura em forma de espiral (A); Adulto recém-emergido de uma abertura em forma de “T” invertido na parte anterior da pupa (B); Adulto após emergência com cabeça amarelada, com tórax e abdome de coloração alaranjada (C); Adultos após 24 h da emergência adquirem coloração do corpo cinza-escuro (D).



De acordo com os mesmos autores citados, decorridos 7 - 10 dias a ninfa eclode, no primeiro ínstar (7 - 16 dias de duração) são bastante ativas, com seis pernas, movem-se por um curto período de tempo e depois inserem as peças bucais nas folhas e começam, então, a sugar a seiva elaborada. No segundo instar, a ninfa tem a forma oval e mais convexa e de coloração marrom escuro com espinhos sobre o corpo. No terceiro, que dura de 6 - 20 dias possui coloração negra. O quarto e último ínstar (16 - 20 dias) são chamados de pupário, o qual é brilhante e circundado por secreção cerosa branca com grandes cerdas dorsais, semelhante a uma “franja”. O adulto emerge de uma abertura em forma de “T” invertido na parte anterior da pupa. O ciclo de ovo a adulto é de 45-133 dias, dependendo da temperatura (Figura 2) (LOPES et al., 2009; RAGA; COSTA, 2008).

Figura 2. Estádios ninfais de mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi*. A) 1º ínstar; B) 2º ínstar; C) 3º ínstar e D) 4º ínstar ou "pupa".



A fecundidade e sobrevivência de *A. woglumi* estão diretamente relacionadas com a planta hospedeira e seu desenvolvimento é favorecido por temperaturas entre 28 e 32 °C e umidade relativa do ar elevada, entre 70 e 80 %. Pode ser encontrada durante todo o ano, entretanto a sua reprodução é baixa nos meses mais frios e chuvosos (LOPES et al., 2009).

Diante do fato que o controle de diversas pragas agrícolas tem sido feito com o uso de inseticidas sintéticos, apesar de sua significativa contribuição para a agricultura, o uso intensivo destes produtos favorece o surgimento de pragas secundárias e conferem alta toxicidade ao ambiente e à saúde humana (MARQUES et al., 2004). Com o passar dos anos, pesquisas tem se intensificado em garantir outras formas de controle da mosca negra em detrimento do químico, como o controle cultural, controle alternativo e controle biológico.

2.3 Manejo de *Aleurocanthus woglumi*

Até o ano de 2007 não existia produto inseticida para o controle de *A. woglumi* registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por se tratar de uma praga recém introduzida no Brasil. Um ano depois em decorrência da agressividade que a praga se espalhava pelo Brasil três produtos foram registrados para *A. woglumi*.

Um inseticida de contato e ingestão do grupo químico Piretróide (lambda-cialotrina) e Antranilamida (chlorantranilipole), classificação toxicológica II – altamente tóxico, classificação do potencial de periculosidade ambiental I - produto altamente perigoso ao meio ambiente; e dois inseticidas sistêmicos do grupo químico: neonicotinóide, classificação toxicológica III – medianamente tóxico, classificação do potencial de periculosidade ambiental III – produto perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2014).

Mesmo com a alta eficiência de controle mediante as aplicações de inseticidas na redução das infestações de mosca negra, esta tática de controle não é amplamente recomendada devida a contaminação do meio ambiente, dos animais, dos inimigos naturais e do próprio homem pelos resíduos tóxicos destes produtos (HEU; NAGAMINE, 2001).

O controle cultural da mosca negra dos citros é baseado em molhar as linhas de plantio, com água ou óleo, a fim de se evitar poeira nas folhas, favorecendo o desenvolvimento dos inimigos naturais da praga; manter as barreiras naturais de vento como proteção; manter o cultivo seguindo os cuidados de fertilização, drenagem e outros tratamentos culturais; comprar somente mudas com garantia dos órgãos competentes, além de podar e queimar ramos e galhos atacados pela praga (FRENCH; MEAGHER, 1992).

O controle alternativo da praga também vem sendo amplamente estudado como substituição ao uso de inseticidas sintéticos. Segundo pesquisa realizada pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (Emepa), que testou 50 produtos em campo contra mosca negra, selecionou o óleo mineral, óleo vegetal, óleo de nim, óleo de casca de laranja e detergente como eficientes no controle dos insetos na fase adulta, porém os experimentos de campo provaram que apenas o detergente e o óleo da casca de laranja foram 100 % eficientes contra todas as formas jovens (ninfas) deste inseto, sendo necessárias, porém, mais de três pulverizações (PROSA RURAL, 2014).

A utilização de produtos naturais como os extratos de plantas, tem apresentando resultados satisfatórios no controle da mosca negra, apresentando diversas vantagens ao se comparar com o químico, como sua fácil aquisição, preparo da calda simplificada e forma de utilização, além de reduzirem em potencial os impactos ambientais por serem de fácil degradação (ALMEIDA et al., 1999). Segundo Vieira et al. (2013) quando avaliaram a aplicação de cinco óleos vegetais comerciais no controle ovicida de *A. woglumi*, relataram que os óleos comerciais de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labil.), alho (*Allium sativum* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) mostram-se eficientes como uma alternativa promissora no controle de *A. woglumi*.

Da mesma maneira, Silva et al. (2012), constataram ação ovicida e menor percentual de eclosão de ninfas de mosca negra dos citros utilizando óleos vegetais de soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.) algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e extrato de nim (*Azadirachta indica* A. Juss), comprovando que este inseto pode ser

combatido de forma eficiente por métodos diferentes do controle químico. Segundo Martinez (2011), os extratos de nim apresentam como ingrediente ativo mais potente, a azadiractina, que pode causar inibição da alimentação do inseto, afetar o desenvolvimento e atrasar seu crescimento, reduzir a fecundidade e fertilidade dos machos, alterar seu comportamento e causar diversas anomalias nas células e na fisiologia dos insetos, além da mortalidade de ovos, larvas e adultos.

O óleo de nim apresentou maior porcentagem de controle dos ovos de aleirodídeos (64,16 %) e interferiu ainda na eclosão de ninfas sendo uma alternativa de controle, uma vez que, a fase de ovo é a mais difícil de ser controlada (TAVARES, 2010). Ao avaliar o impacto de extratos de nim nas fases de desenvolvimento da mosca branca, Murakami et al. (2014), confirmaram o sucesso do controle desse extrato no manejo deste hemíptero, contudo ressaltaram que há necessidade de um estudo mais aprofundado sobre sua resposta em condições de campo, buscando resultados favoráveis a um manejo integrado desta praga.

No estado da Paraíba algumas famílias de Lagoa Seca, Matinhas e Alagoa Nova visando promover ações complementares a fim de minimizar a infestação da mosca negra, testaram alguns produtos naturais e que vêm obtendo sucesso no controle. Desenvolveram produtos utilizando a castanha-de-caju, manipueira, maniçoba, angico, nim e a urina de vaca. Após vários testes em campo, os resultados mostram que estas substâncias foram tão ou mais eficientes do que o produto químico, além de não agredirem a natureza e a saúde dos agricultores e dos consumidores (FOLHA AGROECOLÓGICA, 2011).

2.3.1 Controle Biológico de *Aleurocanthus woglumi*

Pelos conhecimentos já acumulados em relação ao controle químico em diversas regiões e países, sabe-se que a eficiência no controle da mosca negra somente alcançará o sucesso por meio da adoção de medidas baseadas na preservação da biodiversidade e no uso de estratégias ecológicas, o controle biológico, ou seja, por meio da produção e disseminação dos inimigos naturais desta praga.

Segundo Gallo et al. (2002), o controle biológico é o alicerce dos programas de manejo integrado de pragas (MIP), visando a adoção de diferentes estratégias de controle com o intuito de reduzir o impacto dos insetos considerados como pragas, diminuindo ao máximo o uso e os efeitos negativos de inseticidas químicos para seu controle. Predadores e

parasitóides foram identificados como potenciais agentes de controle biológico dessa praga (MAIA et al., 2004).

A mosca negra dos citros apresenta diversos inimigos naturais, com destaque para os micro - himenópteros *Amitus hesperidum* Silvestri e *Encarsia opulenta* Silvestri, cujo controle biológico é amplamente utilizado mundialmente (NGUYEN et al., 1983). Imperato (2014) identificou duas espécies novas de *Encarsia* parasitando ninfas de *A. woglumi*. Ambas as espécies, pertencem ao grupo *strenua*.

Martínez et al. (1979) relatam outros organismos que também exercem importante papel no controle biológico de *A. woglumi*, como os predadores *Azya trinitatis* Marshall (Coleoptera: Coccinellidae), *Pentilia castanea* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), *Azya* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Curinus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Delphastus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Diomus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) e *Stethorus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Mantispilla provavelmente viridis* Walker (Neuroptera: Mantispidae), *Chrysopa* sp. e *Nodita* sp. (Neuroptera: Chrysopidae); e os parasitóides *Cales* sp., *Prospaltella* sp. e *Eretmocerus* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae).

Queiroz e Telles (2009) constataram que os crisopídeos apresentam potencial para serem utilizados no controle da mosca negra, em combinação com outros métodos dentro do manejo integrado de pragas na região de Manaus.

Maia et al. (2004) em vários municípios do Pará registraram a ocorrência de inimigos naturais associados a mosca negra. Os autores identificaram a presença de predadores das Ordens Coleoptera, Neuroptera, Diptera (*Pseudodorus clavatus* Fabricius) e um parasitóide, *Aphytis* sp. Da mesma forma, Mendonça et al. (2004) observaram a presença de predadores das mesmas ordens citadas. Os resultados mostraram maior frequência e abundância dos grupos de predadores dos gêneros *Chrysoperla* sp., *Ceraeochrysa* sp. e *Stethorus* sp.

No Maranhão a ocorrência de inimigos naturais associados à mosca negra foram descritos por Machado et al. (2012), que relataram a presença dos parasitoides, *Cales noacki* Howard (Hymenoptera: Aphelinidae), *Encarsia* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae) e *Gonatocerus* sp. (Hymenoptera: Mymaridae) e, dos predadores, *Amblyseius aerialis* Muma (Acari: Phytoseiidae) e *Delphastus pusillus* LeConte (Coleoptera: Coccinellidae).

Uma alternativa que vem sendo bastante utilizada para o controle biológico da praga são os fungos entomopatogênicos, que são fungos capazes de parasitar insetos, matando-os ou incapacitando-os. Uma vez que são considerados agentes de mortalidade natural e ambientalmente seguros, é crescente o interesse em ampliar os estudos na utilização e manipulação destes fungos para o controle biológico de insetos (SANTORO et al., 2007).

Uma vantagem na utilização de entomopatógenos no controle de insetos-praga, é a capacidade dos fungos atacarem um grande número de insetos em praticamente todos os estádios de desenvolvimento, além de possuir uma grande variabilidade genética, permitindo estudos de seleção de isolados e avaliação dos mais virulentos contra determinada praga (ALMEIDA; MACHADO, 2006). Além de tudo, podem acometer as gerações futuras, reduzindo a oviposição, a viabilidade de posturas e aumentando a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos (ALVES, 1998).

No Brasil, as primeiras pesquisas com entomopatógenos associados a mosca negra dos citros foram desenvolvidas por Batista et al. (2002) no Pará, que identificaram em pomares cítricos, os fungos *Archersonia aleyrodis* Webber, *Fusarium* sp. e *Aegerita webberi* Pers. O Instituto Biológico de São Paulo, detectou no município de Artur Nogueira, a presença do fungo *A. aleyrodis* atacando ninfas de *A. woglumi* em condições favoráveis de epizootia (RAGA; COSTA, 2008). Pena et al. (2009), em observações de campo verificaram o crescimento maciço de *A. aleyrodis* associados à mosca negra dos citros em folhas de laranja e tangerina causando a morte deste inseto no estado do Amazonas.

As espécies do gênero *Aschersonia* são relatadas controlando aleirodídeos (ALVES, 1998; LOURENÇÃO et al., 1999; ROJAS, 2000; MEEKES et al., 2000; MEEKES et al., 2002; LIU et al., 2006). No Brasil, a ocorrência de *Aschersonia* sp. em mosca branca é muito comum, aparecendo em diversas regiões onde citros são cultivados (ALVES, 1998). Segundo Oliveira et al. (1999) o fungo *A. aleyrodis* é eficiente no controle de *A. woglumi*, em diversas partes do mundo.

Silva et al. (2010) avaliando o efeito de diferentes inóculos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre ovos e ninfas da mosca negra dos citros, afirmaram que ambos foram eficientes no controle dessa praga, sendo que *B. bassiana* foi mais eficiente na fase de ninfa e na fase de ovo *M. anisopliae* causou maior mortalidade.

Potrich et al. (2011) avaliando a virulência dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria* sp. a ninfas de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) revelaram que quando utilizados na concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL⁻¹ os isolados de *Isaria* sp. ocasionaram mortalidade de 98,6 %, *B. bassiana* mortalidade de 84,1 % e o isolado *M. anisopliae* provocou a menor mortalidade de apenas 23,2 % das ninfas.

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Entomologia e Fitopatologia do Núcleo de Biotecnologia Agrônômica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão em São Luís – MA.

3.1 Coleta e manutenção das ninfas de *a. woglumi*

Para os bioensaios foram utilizadas folhas de plantas de citros infestadas com ninfas de mosca negra. A abscisão das folhas foi realizada com auxílio de uma tesoura de poda e o corte em forma de bisel, próximo à inserção do ramo. As ninfas foram selecionadas ao acaso, contadas e o excesso eliminado com auxílio de um estilete. As regiões contendo os insetos foram demarcados com caneta de retroprojektor de ponta de 1 mm, para facilitar o registro e controle dos dados. O pecíolo foi envolvido em algodão umedecido com água destilada diariamente, evitando o ressecamento precoce do material vegetal e mantidas no Laboratório de Entomologia em câmara climatizada com temperatura de $26 \pm 1^\circ \text{C}$; UR: $80 \pm 5 \%$ e fotofase de 12 h.

3.2 Obtenção dos isolados de fungos entomopatogênicos

Foram coletadas folhas de *Citrus* sp, onde havia ninfas de mosca negra mortas colonizadas pelos fungos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. Fragmentos de colônia presentes nas folhas foram submetidos a uma desinfecção superficial nas soluções de hipoclorito 3 %, álcool 70 % e lavados em água destilada. Em seguida, estes fragmentos foram colocados para secar em papel toalha. Após secagem, foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, 200 g; dextrose, 20 g; ágar, 20 g; água destilada, 1 L) e colocados em incubadora BOD à temperatura de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotofase de 12 h, até a produção de esporos.

Os isolados dos fungos foram preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA armazenados em BOD a 18°C no método de conservação de Repique contínuo e

ainda nos métodos de Castellani e no método de liofilização. Estes foram depositados na Micoteca Prof. "Gilson Soares da Silva" do Laboratório de Fitopatologia da UEMA, sob registro de MGSS 61 e MGSS 167, respectivamente. Já os isolados de *Beauveria bassiana* (MGSS 129) e *Metarhizium anisopliae* (MGSS 131) foram obtidos na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UEMA,

Para execução do experimento os conídios foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura completo: 0,36 g de fosfato de potássio; 1,05 g de fosfato de sódio; 0,6 g de sulfato de magnésio; 1,0 g de cloreto de potássio; 10 g de glicose; 1,58 g de nitrato de sódio; 5,0 g de extrato de levedura; 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada. Esse meio foi posteriormente autoclavado a 120° C por 20 minutos e espalhado nas placas de Petri. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizadas do tipo BOD a 26±0,5° C; UR: 80±5 %; e fotofase de 12 h durante um período de 14 dias para crescimento e esporulação do fungo, segundo metodologia proposta por Macedo (2005).

3.3 Preparo das suspensões de conídios

Para o preparo das suspensões, as placas de Petri contendo os patógenos após 14 dias foram raspadas com o auxílio de lâmina esterilizada. Em seguida, os conídios foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de água destilada e espalhante adesivo a 0,01% (Tween 80). Uma gota da solução foi transferida para câmara de Neubauer para a contagem dos conídios. A partir dessa contagem foram preparadas as suspensões dos isolados dos fungos em diferentes concentrações para as pulverizações.

3.4 Avaliação da eficiência dos fungos entomopatogênicos no controle da mosca negra dos citros

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Entomologia e Fitopatologia consistiu em avaliar a patogenicidade de isolados de *A. aleyrodis*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria* sp. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (quatro fungos e uma testemunha) e seis repetições (folhas de citros contendo 30 ninfas de 3° instar cada, totalizando 180 ninfas por tratamento).

Os testes foram realizados em placas de Petri contendo uma camada de papel toalha circular esterilizado, onde foi colocada uma folha de citros por placa, contendo 30 ninfas e em seguida foi realizada a pulverização de 2 mL da suspensão de conídios na concentração de 1 x

10^7 conídios/mL⁻¹ usando-se torre de Potter e mais a testemunha que foi pulverizada com água destilada. Em seguida as placas foram cobertas com filme plástico perfurado e incubadas em câmara climatizada ($26 \pm 1^\circ$ C e fotofase de 12 h).

Para a confirmação da morte das ninfas, os cadáveres foram submetidos a uma assepsia em álcool 70 %, colocados em papel filtro esterilizado e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura tipo BDA para que com a esporulação e o crescimento micelial pudesse ser feita a avaliação da taxa de infecção dos fungos entomopatogênicos sobre a mosca negra dos citros.

As avaliações foram realizadas por dez dias consecutivos após a aplicação, posteriormente foram calculados os dados de mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação do fungo), mortalidade total (mortalidade independente da causa) e mortalidade corrigida calculada pela fórmula de Abbott (1925) descrita a seguir:

$$Mc(\%) = [(\% Mo - \% Mt) / (100 - \% Mt) \times 100], \text{ onde:}$$

Mc = Mortalidade corrigida

Mo = Mortalidade observada total

Mt = Mortalidade na testemunha

Foram avaliadas as diferenças significativas entre espécies de entomopatógenos. Os dados (mortalidades totais, corrigida e confirmada) foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Os percentuais de eficiência foram calculados através da fórmula de Abbott (1925). O programa estatístico utilizado para análise de dados foi STATISTIC 2010.

3.5 Avaliação de diferentes meios de cultura no crescimento micelial, esporulação e germinação de fungos entomopatogênicos

O crescimento micelial, esporulação e germinação dos fungos que apresentaram melhores resultados no primeiro teste foram comparados em três diferentes meio de cultura (Completo, BDA e BDA sintético) como forma de avaliação do desempenho dos fungos para escolha de um meio potencialmente melhor na fabricação em larga escala.

Para verificar o efeito dos meios sobre o crescimento micelial de *A. aleyrodis* e *Isaria* sp., estes foram colocados em placas de Petri. Em seguida, um disco de 6 mm de diâmetro, com dez dias de idade em BDA, contendo micélio destes fungos foi repicado para o centro das placas, que foram vedadas com filme plástico e mantidas em BOD, a $26\pm 0,5^\circ$ C; UR: 80 ± 5 % e fotofase de 12 h.

A avaliação foi realizada através de medições diárias do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas), iniciando-se 24 horas após a repicagem do fungo, e perdurando por 10 dias. Após as medições, cada placa teve sua média de crescimento calculada.

Ao término do teste de crescimento micelial, após 10 dias de incubação, foi feito o teste de produção de conídios dos fungos *A. aleyrodis* e *Isaria* sp. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos através da adição de 10 mL de água destilada esterelizada e espalhante adesivo a 0,01 % (Tween 80) em cada placa, fazendo-se em seguida a raspagem da colônia com o auxílio de lâmina de microscópio, para liberação dos conídios, e filtragem em gaze, sendo determinado o número de esporos/ml⁻¹ com auxílio de uma câmara de Neubauer ao microscópio ótico.

A germinação dos conídios foi avaliada, através de microcultivo e exame direto em lâminas de microscopia esterilizada, previamente foram colocados três discos de 0,6 mm de meio de cultura na face superior. Sobre o meio de cultura foi inoculado, em cada disco, uma gota da suspensão fúngica obtida de colônias crescidas e cobertas por uma lamínula. As lâminas, acondicionadas individualmente em câmara úmida (placa de Petri esterilizada com um disco de papel filtro umedecido) para manter um microclima favorável para germinação dos conídios. As placas foram incubadas a 26° C e 12 h de fotofase durante 24 h. Após esse período, foi realizada a observação de 150 conídios em cada área da lâmina, utilizando-se microscópio com aumento de 400x. Foram contados conídios germinados e não germinados, estabelecendo-se depois a porcentagem de germinação. Cada placa correspondeu a uma repetição, confeccionando-se três lâminas.

Os dois experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (meio completo, meio BDA e meio BDA artificial) e 8 repetições. Os dados de diâmetro de colônia, contagem de conídios e germinação foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey para comparação de médias, a 5 % de significância pelo

programa ASSISTAT 7.5 beta.

3.6 Determinação da Concentração Mediana Letal (CL₅₀) e Tempo Mediano Letal (TL₅₀) dos fungos entomopatogênicos em ninfas de *A. woglumi*.

Neste bioensaio os fungos entomopatogênicos mais promissores do teste de avaliação da eficiência foram avaliados com o intuito de determinar a melhor concentração das suspensões fúngicas no controle de *A. woglumi*.

Foram montados dois experimentos sendo que os tratamentos foram compostos pelos fungos *A. aleyrodis* e *Isaria* sp. em seis diferentes concentrações (5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 conídios/mL⁻¹) e água destilada como testemunha. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 5 repetições.

Para realização do experimento folhas de *Citrus* sp., contendo 30 ninfas de 3º ínstar por folha, foram pulverizadas com 150 µl de suspensão em cada tratamento com o auxílio de pulverizador do tipo *airbrush* a uma distância de 5 cm da folha e colocadas para secar sobre papel toalha ao ar livre por 30 minutos para a perda do excesso de umidade superficial. Em seguida cada folha foi acondicionada em placa de Petri 90 mm de diâmetro, contendo papel toalha que era umedecido sempre que necessário, para manter a turgescência das folhas e assim evitar a morte das ninfas por falta de alimento e ressecamento.

As placas foram vedadas com filme plástico, perfurado com um alfinete entomológico, sendo mantidas em câmara climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h). As avaliações foram também realizadas por dez dias consecutivos após a aplicação. Os insetos mortos foram transferidos para placas de Petri com algodão úmido (câmara úmida) e colocados em câmara de germinação tipo BOD, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h, por 10 dias, para confirmação da mortalidade causada pelo patógeno.

Foram calculados os dados de mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação do fungo), mortalidade total (mortalidade independente da causa) e mortalidade corrigida calculada pela fórmula de Abbott (1925) descrita a seguir:

$$Mc (\%) = [(\% Mo - \% Mt) / (100 - \% Mt) \times 100], \text{ onde:}$$

Mc = Mortalidade corrigida

Mo = Mortalidade observada

Mt = Mortalidade na testemunha

Foram avaliadas as diferenças significativas entre as concentrações empregadas e espécies de entomopatógenos. Os dados (mortalidades totais, corrigida e confirmada) foram submetidos à análise de variância e posteriormente ao teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5 % de probabilidade e análise de regressão. O programa estatístico utilizado para análise de dados foi STATISTIC 2010. Tempo mediano Letal (TL₅₀) e a concentração mediana letal (CL₅₀) necessária para provocar a mortalidade de 50 % das ninfas foi determinada pela análise de Probit (SAS[®] Institute, 2001).

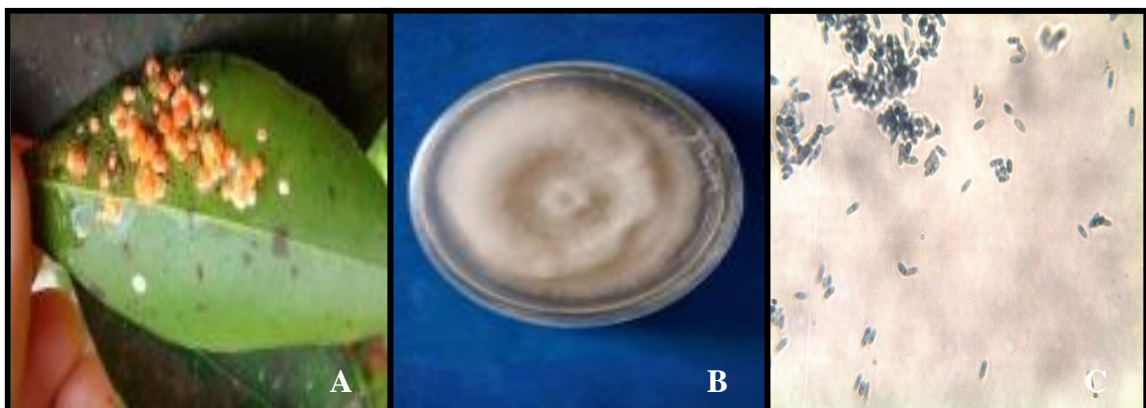
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características morfológicas dos fungos entomopatogênicos

O crescimento de *A. aleyrodis* e *Isaria* sp. foram observados em diferentes locais de coletas em campo associados à mosca negra, em folhas de laranja e limão causando a morte deste inseto. Foram registrados nos municípios de Morros, São Luís, Itapecuru e Presidente Juscelino.

As colônias de *A. aleyrodis* em epizootias naturais apresentam coloração alaranjada e são hemisféricas ou em forma de almofada. Cultivado em meio completo, o isolado apresentou coloração rósea, com o reverso alaranjado, bordas lisas e bem definidas, crescimento cotonoso e formação concêntrica (Figura 3).

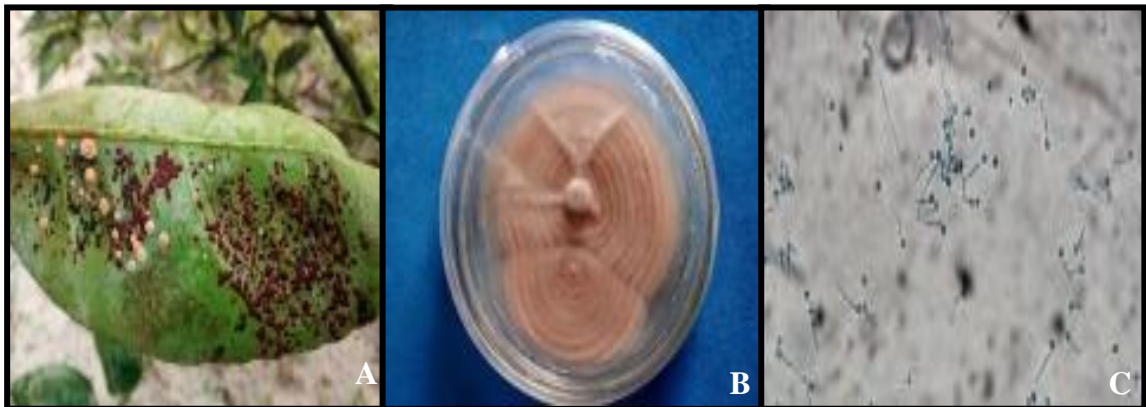
Figura 3. A) Colônias de *A. aleyrodis* associadas à mosca negra dos citros no campo; B) Aspecto aos dez dias de incubação e C) Conídios de isolado *A. aleyrodis*.



Os fungos entomopatogênicos das espécies do gênero *Isaria* são encontrados atacando insetos de diversas ordens, bem como nematódeos. Este gênero é um dos mais utilizados em programas de controle biológico, sendo empregado em escala comercial na Europa e nas Américas do Norte e Sul (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

Foram encontrados isolados deste fungo no Maranhão nos municípios de Morros, Itapecuru e São Luís causando epizootias em populações de *A. woglumi* em espécies cítricas. Suas colônias em epizootias naturais apresentam coloração com tons de lilás e com crescimento concêntrico. Colônias cultivadas em meio completo crescem relativamente rápido, atingindo um diâmetro em média de 4 a 6,55 cm em 10 dias a 26°C. O reverso é por vezes incolor, mas geralmente apresenta-se em tons vináceos (Figura 4).

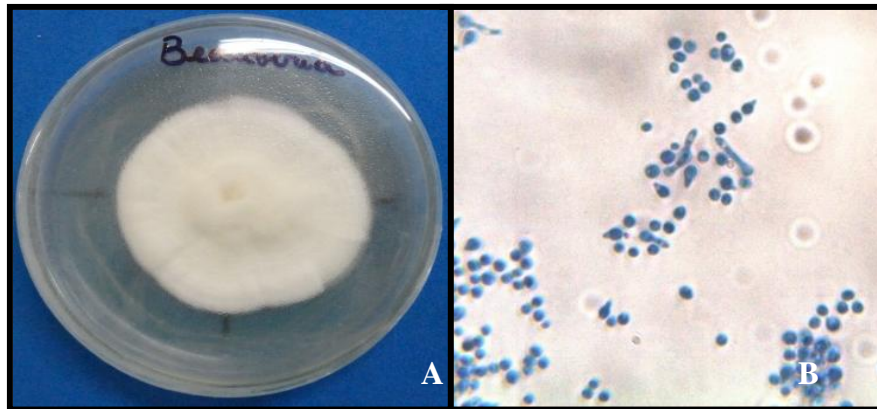
Figura 4. A) Colônias de *Isaria* sp. associadas à mosca negra dos citros no campo; B) Aspecto aos dez dias de incubação e C) Conídios de isolados *Isaria* sp.



Segundo Samson (1974), as espécies classificadas na seção Isarioidea são na maioria entomopatogênicas, apresentam colônias com coloração viva, brilhante, podendo ser branca, rosa ou violeta. Colônias com crescimento rápido em meio de cultura, atingindo um diâmetro de 5 a 7 centímetros com 14 dias a 25° C. Apresentando um crescimento flocoso do micélio aéreo. Inicialmente, a colônia é branca, mas quando esporula torna-se lilás vináceo. A parte inferior algumas vezes apresenta-se incolor, mas frequentemente com sombreado vinho, se aproximando de uma coloração avermelhada a púrpura.

As colônias apresentaram um micélio abundante, branco ou ligeiramente corado, com aparência de pó; conidióforos simples, agrupados de forma irregular ou em grupos verticilados, inflado na base e afinando para a parte fértil delgada que aparece em zigue zague (Figura 5).

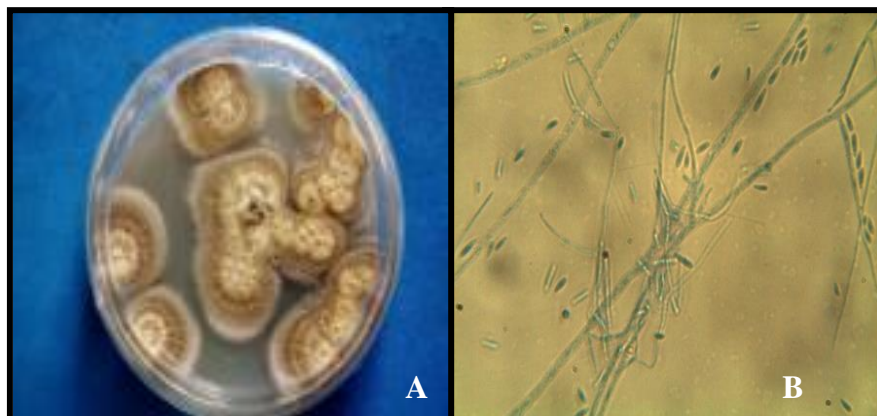
Figura 5. A) Aspecto da colônia de *B. bassiana* aos dez dias de incubação ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotofase de 12h); B) Conídios de isolados *B. bassiana* provenientes da Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" do Laboratório de Fitopatologia da UEMA.



Morfológicamente *Beauveria* é facilmente identificada devido à formação septada de suas hifas de 2,5-25 μm de diâmetro, de onde se formam conidióforos simples que raramente são agrupados, com aparência mais larga no centro do que nas extremidades, o qual sustenta os conídios, originário de uma simpodial ou acrópeta (CARRILLO, 2005).

As colônias de *M. anisopliae* apresentaram conidióforos hialinos, ramificados, formando uma camada de esporulação; fiáldes únicos, em pares, ou em espirais; conídios produzidos em cadeias basípeta, compactados em colunas, longo e cilíndrico, unicelular, levemente pigmentada de verde oliva com a parte central amarelada (Figura 6).

Figura 6. A) Aspecto da colônia de *M. anisopliae* aos dez dias de incubação ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotofase de 12h); B) Conídios de isolados *M. anisopliae* provenientes da Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" do Laboratório de Fitopatologia da UEMA.



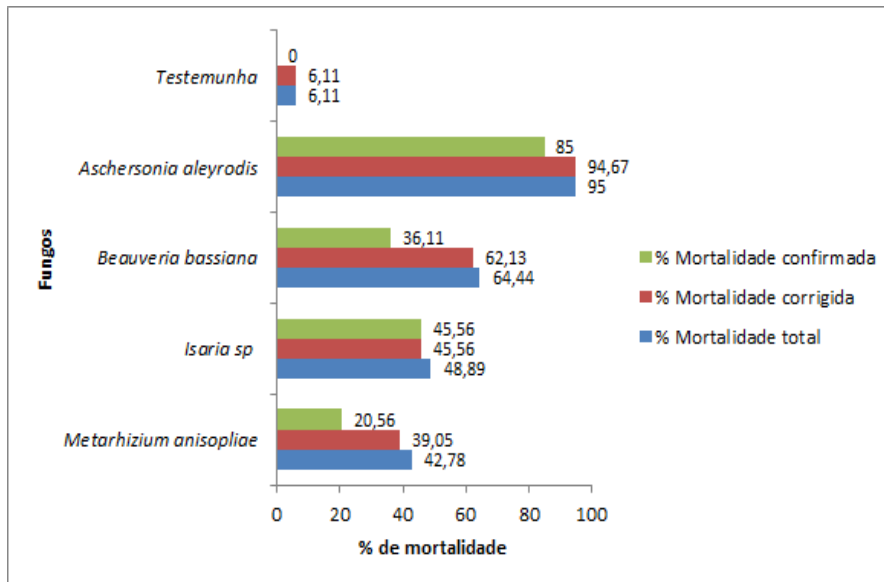
Estas características foram observadas por Yip et al. (1993) que em seu trabalho avaliou 204 culturas de *M. anisopliae* isoladas de solos. Da mesma forma, Macedo (2005) ao selecionar isolados de *M. anisopliae* para controle de insetos constatou que todos os isolados

apresentaram coloração das colônias que variavam de verde acinzentado ao verde escuro, conídios hialinos e conidióforos simples.

4.2 Avaliação da eficiência dos fungos entomopatogênicos no controle da mosca negra dos citros

Os isolados testados no presente estudo foram patogênicos, no entanto, apresentaram grande variação na atividade e com mortalidade total entre 42,78 a 95 %. A mortalidade confirmada, também obteve grande variação entre os fungos de 20,56 % a 85,0 % (Figura 7).

Figura 7. Mortalidade total, Mortalidade corrigida e Mortalidade confirmada após 10 dias da pulverização na concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹ dos fungos *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Isaria* sp. e *Metarhizium anisopliae*.



O fungo *A. aleyrodis* obteve os maiores percentuais de mortalidade total (95 %) assim como da mortalidade confirmada atingindo 85 % do total de insetos, diferindo estatisticamente dos demais isolados, evidenciando ser promissor no controle da mosca negra. *Isaria* sp. apresentou 45,56 % de mortalidade confirmada superando os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, diferindo da testemunha (Tabela 1). Resultados semelhantes foram descritos por Wang et al. (2013) que em estudos realizados para seleção de potenciais agentes biológicos para o controle *Dialeurodes citri* (Hemiptera-Aleyrodidae), em pomares de citros, observaram que a concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹ mostrou ampla patogenicidade para as ninfas em isolados do gênero *Aschersonia* promovendo uma mortalidade que variou de 0 % a 72,70 %.

A alta porcentagem de mortalidade da mosca negra, como apresentada nesse estudo por *A. aleyrodis* implica na redução populacional dessa praga, no entanto segundo o estudo de Alves (1998), a esporulação dos cadáveres é um fator importante para a disseminação da doença, fato diretamente ligado às condições do ambiente, ao isolado e também ao tamanho do hospedeiro (ALVES, 1998).

Estudos realizados demonstram que os insetos hospedeiros de *Aschersonia* sp. estão frequentemente associados às famílias Aleyrodidae e Coccidae na ordem Hemiptera confirmando que os fungos entomopatogênicos podem ser utilizados como importantes inimigos naturais de aleirodídeos (PENA et al., 2009).

Em relação ao fungo *B. bassiana* apesar de apresentar altos valores de mortalidade total e corrigida, as mortes dos insetos não foram confirmadas por infecção dos fungos pulverizados. Apresentando apenas 36,11 % da mortalidade confirmada. A menor mortalidade ocorreu quando foi utilizado o fungo *M. anisopliae*, que não diferiu estatisticamente de *B. bassiana* e nem da testemunha (Tabela1). Os resultados desta pesquisa são semelhante ao descrito por Silva et al. (2009) onde relataram em seus testes reduzidos valores de mortalidade para *B. bassiana* quando utilizado na concentração de 1×10^7 conídios/mL⁻¹ atingindo apenas 30 % da mortalidade para ninfas de insetos da ordem Hemiptera. ~

Resultado similar foi obtido por Rheinheimer (2006), testando isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de *Bemisia tuberculata* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae) sugerindo a baixa eficiência de mortalidade confirmada demonstrando valores inferiores a 50 %. Sendo os isolados de *B. bassiana* os mais eficientes na mortalidade de ninfas de mosca-branca em relação aos isolados de *M. anisopliae* como evidenciados na presente pesquisa.

Tabela 1. Taxa de mortalidade (%) de ninfas de *Aleurocanthus woglumi* submetidos a diferentes tratamentos 10 dias após, São Luís – MA

Taxa de mortalidade (%) (EP) ¹			
Tratamentos	Mortalidade total (%)	Mortalidade corrigida (%)	Mortalidade confirmada (%)
Testemunha	6,11 (1,83) c	6,11(1,02) b	0,0 (0,0) c
<i>M.anisopliae</i>	42,78 (12,83) bc	39,05 (1,08) b	20,56 (3,42) bc
<i>Isaria</i> sp	48,89 (14,66) abc	45,56 (2,17) ab	45,56 (7,59) b
<i>B.bassiana</i>	64,44 (19,33) ab	62,13 (4,93) ab	36,11 (4,53) bc
<i>A.aleyrodia</i>	95 (28,50) a	94,67 (10,35) a	85,0 (14,17) a

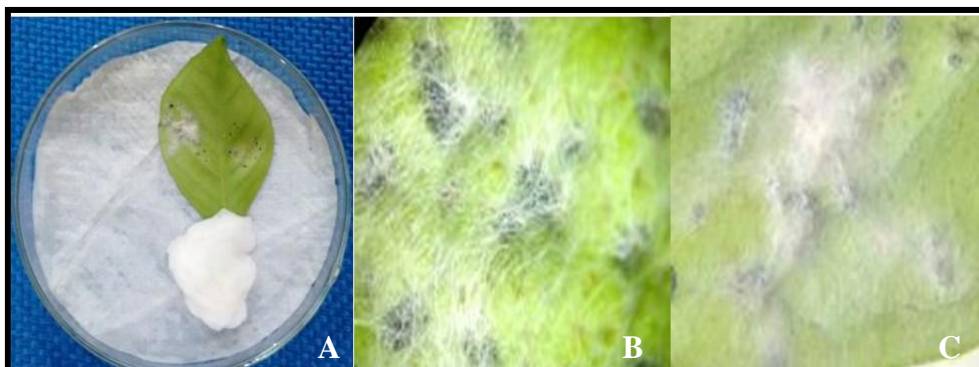
As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

¹ significância da comparação estatística entre médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Resultado semelhante foi encontrado por Potrich et al. (2011) que avaliaram a virulência de fungos entomopatogênicos a ninfas de mosca branca, ressaltando que os isolados de *Isaria* sp. provocaram altos índices de mortalidade confirmada. Da mesma maneira, testando virulência de fungos entomopatogênicos sobre Hemiptera: Aleyrodidae, Vital et al. (2012) confirmaram que isolados de *I. fumosorosea* causaram altas mortalidades de ninfas após pulverização de uma dose padrão de 1×10^7 conídios/mL corroborando com os resultados desta pesquisa.

Inicialmente o crescimento de *A. aleyrodia* sobre o inseto é branco, de aspecto cotonoso, tornando-se posteriormente alaranjado (Figura 8 A). As ninfas ficam mumificadas com sintomas de deterioração e dissolução dos tecidos orgânicos (Figura 8 B). A ação do fungo pode também impedir a troca completa da exúvia, pigmentando o novo tegumento em tom alaranjado (Figura 8 C) e inviabilizando o desenvolvimento das fases subsequentes como descrito por Pena et al. (2009).

Figura 8. Mortalidade confirmada das ninfas de 3º ínstar de mosca negra pelo fungo *A. aleyrodia*.



Quando o fungo está completamente desenvolvido recobre as ninfas, adquirindo a coloração característica de um alaranjado intenso podendo crescer e atingir as ninfas vizinhas. O fato das ninfas se encontrarem muito próximas uma das outras e serem imóveis pode explicar os altos índices de contaminação da mosca negra dos citros por este fungo (Figura 8 C). Pena e Silva (2007) relataram em seu trabalho que embora o fungo *A. aleyrodis* tenha apresentado um crescimento lento no meio de cultura testado, foi eficiente no controle da mosca negra dos citros identificando que as maiores mortalidades ocorreram nas fases mais jovens de *A. woglumi* como ovo, ninfa 2 e ninfa 1, não havendo diferença estatística entre elas.

As ninfas pulverizadas com *B. bassiana* apresentaram um crescimento esbranquiçado sobre a cutícula da mosca negra. Com o decorrer dos dias o inseto apresentou-se totalmente colonizado, e seu tegumento bastante atacado, resultando na morte da ninfa, possivelmente, em função da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas decorrentes da ação do fungo. Sobre o cadáver ocorreu a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios característicos do gênero *Beauveria*. De acordo com Alves e Pereira (1998) o fungo *B. bassiana* provoca distúrbios fisiológicos que atingem o tegumento, o sistema circulatório, reprodutor, respiratório, nervoso e digestivo dos insetos infectados. Por serem considerados de largo espectro, podem atacar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, desde o ovo até a fase adulta, uma característica desejável e muito característica desse grupo.

Os insetos atacados por *M. anisopliae* tornam-se rígidos e cobertos por uma camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese, o cadáver pode mostrar tons de verde que variam de claro a escuro, acinzentados ou ainda embranquecidos com pontos verdes. Segundo Freimoser et al. (2003), após a germinação de *M. anisopliae* as hifas penetram na cutícula, a partir daí este fungo passa a se desenvolver no interior do corpo do hospedeiro, eventualmente matando o inseto em poucos dias; este efeito letal é muito provavelmente auxiliado pela produção de péptidos cíclicos inseticidas (destruxinas). Hsiao e Ko (2001) mencionam as destruxinas produzidas por *M. anisopliae* como desencadeadoras de importantes funções na patogenicidade do fungo, apresentando várias propriedades biológicas, sendo as propriedades inseticidas e fúngicas as mais importantes identificadas.

Sabe-se que existem diversos exemplos bem sucedidos de controle biológico referindo-se ao uso de microrganismos entomopatogênicos, principalmente no que tange o fungo *M. anisopliae* conhecido mundialmente por seu alto potencial no controle de insetos –

pragas. No Brasil, este fungo é amplamente utilizado no controle de larvas de raízes como as da vaquinha do milho e besouros de raízes dos cítricos e outras culturas. Conferindo uma larga faixa de aplicação e é intensamente utilizado em pastagens e cultivo de cana-de-açúcar.

Sosa-Gómez e Alves (1983) avaliando o potencial do uso de isolados de *M. anisopliae* no controle microbiano de insetos consideraram como principais caracteres não só a produção de conídios em meio artificial, mas a sua virulência. Desta forma, faz-se necessário a ampliação de estudos sobre o controle de mosca negra dos citros com *M. anisopliae* como alternativa sustentável em resposta ao uso indiscriminado de pesticidas químicos.

As ninfas infectadas por *Isaria* sp. apresentaram seu corpo coberto por uma camada pulverulenta esbranquiçada evoluindo para tons de rosa e lilás com o decorrer dos dias. Considerando a característica imóvel das ninfas e a ausência de sinais da doença, os insetos foram dados como mortos quanto ao aparecimento da esporulação do fungo.

De acordo com testes preliminares *A. aleyrodis* mostrou-se o mais eficiente no controle da mosca negra dos citros sendo este utilizado no teste de determinação da concentração Letal (CL_{50}) e Tempo Letal (TL_{50}). Apesar de *Isaria* sp. não ter diferido significativamente de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e ter apresentado apenas 45,56 % da mortalidade confirmada foi testado também como sendo promissor no controle biológico da referida praga, uma vez que é constantemente encontrado em pomares cítricos do estado causando mortalidade do inseto em campo.

4.3 Avaliação de diferentes meios de cultura no crescimento micelial, esporulação e germinação de fungos entomopatogênicos

Avaliando-se o crescimento vegetativo de *A. aleyrodis*, observou-se que o maior diâmetro médio foi 6 cm no meio completo, que diferiu significativamente do meio BDA com 5,2 cm e do BDA Sintético com 4,7 cm. Em condições semelhantes Pena et al. (2009) confirmaram um lento crescimento do fungo quando repicado em BDA, sendo verificado que aos trinta e dois dias de idade as colônias apresentaram em média $3,92 \pm 0,33$ (3,30-4,70) cm de diâmetro. Da mesma forma, Oliveira (2008) mostrou que quando são testados os aspectos biológicos de *A. aleyrodis* cultivado em diferentes meios o menor valor de diâmetro amostrado foi das colônias obtidas a partir da produção em BDA.

Em relação ao fungo *Isaria* sp., os valores referentes a crescimento da colônia não diferiram estatisticamente entre os meios testados apresentando valores entre 4,5 e 4,9 cm (Tabela 2), demonstrando alta capacidade de adequação em diferentes tipos de meios. Resultados semelhantes a este foram encontrados por outros autores quando comparado o desenvolvimento do fungo *I. fumosorosea* em diferentes meios (OLIVEIRA et al., 2011; PAMPOLINI et al., 2012).

Tabela 2. Crescimento, Esporulação e Germinação de conídios dos fungos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. comparados em três diferentes tipos de meios de cultura, São Luís – MA.

Tratamentos		Crescimento (cm)	Esporulação (média)	Germinação (%)
MEIOS				
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	BDA	5,2 b	15,79 a	74,38 ab
	MC	6,0 a	14,81 a	88,01 a
	BDA sintético	4,7 c	5,77 b	54,08 b
CV%		4,94	40,38	29,12
<i>Isaria</i> sp.	BDA	4,7 a	29,75 b	94,59 a
	MC	4,9 a	57,39 a	95,41 a
	BDA sintético	4,5 a	26,21 b	91,41 a
CV%		26,52	23,54	13,12

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as médias referentes à esporulação foram transformadas pela \sqrt{x} .

O meio de BDA Sintético produziu, por colônia, os menores valores na produção de conídios quando se comparou os dois fungos com média de 5,77 conídios/mL⁻¹ para *Aschersonia* sp. e 26,21 conídios/mL⁻¹ para *Isaria* sp. A produção das colônias dos fungos em meio MC obtiveram os maiores valores de 14,81 e 57,39 conídios/mL⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Não foi constatado diferença em relação a germinação de conídios referentes ao fungo *Isaria* sp. apresentando em todos os tratamentos valores acima de 90 % de germinação revelando alta germinação de conídios nos três meios testados. Mascarin et al. (2010) selecionando meios de cultura para utilização em produção massal de isolados do gênero *Isaria*, também mostraram que a maior produção de conídios foi quando repicados em meio completo com média de 370 conídios/mL⁻¹. O mesmo foi constatado neste experimento, o fungo *Isaria* sp. apresentou uma alta capacidade de produção de conídios independente do meio empregado, alcançando altas concentrações de suspensão em poucos centímetros de

crescimento de colônia. Ressaltando assim, suas características indispensáveis para utilização em controle microbiano de pragas.

Já em relação a *A. aleyrodis* os meios BDA e BDA Sintético não diferiram entre si, com baixa taxa de germinação e, MC apresentou germinação de 88,01 %, mostrando-se mais promissor a utilização em testes futuros (Tabela 2). O desenvolvimento rápido de colônias de fungos são características que conferem vantagem no controle biológico, pois o hospedeiro é infectado de forma mais rápida e efetiva, pois o maior crescimento das hifas acarreta maior formação de metabólitos secundários pelo fungo, dentre os quais as toxinas que inviabilizará seu hospedeiro. Além disso, possibilita a produção visando à obtenção de um produto comercial.

Neste trabalho foi observado que as colônias com maior esporulação foram observadas quando o fungo foi produzido em meio Completo o que pode estar relacionado com o fato da composição deste meio ser semelhante aos componentes do exoesqueleto dos insetos (quitina), reunindo assim os nutrientes específicos requeridos para desenvolvimento completo do fungo em meio artificial. As diferentes composições dos meios influenciam diretamente no desenvolvimento e na conidiogênese de fungos, respeitando suas necessidades e exigências em fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, ferro, sódio, potássio e outros minerais (LEITE et al., 2003; OLIVEIRA, 2008).

Oliveira (2008) testando aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp. cultivado em diferentes meios de cultura, mostrou que o meio BDA é de fácil manutenção em condições de laboratório e um dos meios mais indicados, principalmente devido à facilidade de produção e ao preço relativamente baixo. Mas o que foi constatado no decorrer dos experimentos é que apesar da facilidade e do baixo custo empregado na produção do meio BDA, este configurou-se o mais propício ao desenvolvimento de organismos infectantes.

Os fungos *Isaria* sp. e *A. aleyrodis* produzidos em meio completo apresentaram percentuais superiores aos demais meios utilizados, corroborando com Francisco et al. (2003) que comprovaram que meios de cultura com alto teor de nutrientes como BDA e meio completo aumentam a viabilidade de conídios favorecendo a germinação e meios com baixas quantidades de nutrientes como ágar-água e meio mínimo promovem baixa germinação.

Os baixos valores encontrados em relação a germinação de *A. aleyrodis* devem estar relacionados ao fato deste fungo apresentar baixa velocidade de crescimento no período de 24 h, como já observado por Pena et al. (2009) quando avaliaram o crescimento deste fungo em BDA.

O meio Completo (MC) foi o escolhido para o desenvolvimento das etapas seguintes, por ter se mostrado mais eficiente para manutenção artificial destes fungos em laboratório, além de desempenhar características favoráveis, tais como: alcançar os maiores valores em crescimento micelial, produção de conídios e germinação de conídios. O meio BDA apesar de muitas vezes não ter se diferenciado significativamente do MC, foi descartado por apresentar uma alta susceptibilidade ao aparecimento de contaminante.

4.4 Determinação da Concentração Mediana Letal (CL₅₀) e Tempo Mediano Letal (TL₅₀) dos fungos entomopatogênicos em ninfas de *A. woglumi*

O fungo *A. aleyrodis* mostrou-se patogênico às ninfas de terceiro ínstar de *A. woglumi* em todas as concentrações avaliadas. Sendo que as maiores porcentagens de mortalidade ao final das avaliações foram registradas nas concentrações 1×10^7 e 5×10^7 conídios/mL⁻¹ que atingiram 87,3 e 82 % de mortalidade confirmada, respectivamente, diferindo estatisticamente somente da concentração 5×10^5 conídios/mL⁻¹ (Tabela 3). Em contrapartida, estudos com *A. aleyrodis* no controle de *T. vaporariorum* revelavam que o maior percentual de mortalidade foi em torno de 90 % dos ovos, ninfas de primeiro e segundo ínstar utilizando uma suspensão de 4×10^6 conídios/mL⁻¹ (FRANSEN; VAN LENTEREN, 1993).

De um modo geral, para o isolado *Isaria* sp. observou-se um incremento significativo na porcentagem de mortalidade das ninfas de *A. woglumi* de acordo com o aumento da concentração do fungo, apresentando o máximo de 61,3 % da mortalidade nas duas maiores concentrações e o mínimo para a menor concentração 9,3 %. Evidenciando que a concentração 5×10^6 conídios/mL⁻¹ não diferiu estatisticamente dos dois melhores resultados (Tabela 3). Resultados contrários foram obtidos por Vital et al. (2014) que avaliando a patogenicidade de *Isaria* sp. na concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹ a ninfas de *Bemisia tabaci* concluiu que a maioria dos isolados causaram mortalidade de ninfas de 2º e 3º ínstar superiores a 80 %.

Tabela 3. Mortalidade confirmada (%) pelos fungos entomopatogênicos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. em diferentes concentrações, após o 10º dia de avaliação, São Luís – MA.

% de Mortalidade confirmada (EP) ¹		
Concentração (conídios/mL ⁻¹)	<i>A. aleyrodis</i>	<i>Isaria</i> sp.
Testemunha	0 (0,0) c	0 (0,0) b
5 x 10 ⁵	35,3 (10,60) bc	9,3 (2,8) b
1 x 10 ⁶	54,0 (16,20) ab	30,7 (9,20) ab
5 x 10 ⁶	75,3 (22,60) a	59,3 (17,80) a
1 x 10 ⁷	87,3 (26,20) a	38,7 (11,60) ab
5 x 10 ⁷	82,0 (24,60) a	61,3 (18,40) a
1 x 10 ⁸	65,3 (19,60) ab	61,3 (18,40) a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

¹ significância da comparação estatística entre médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade

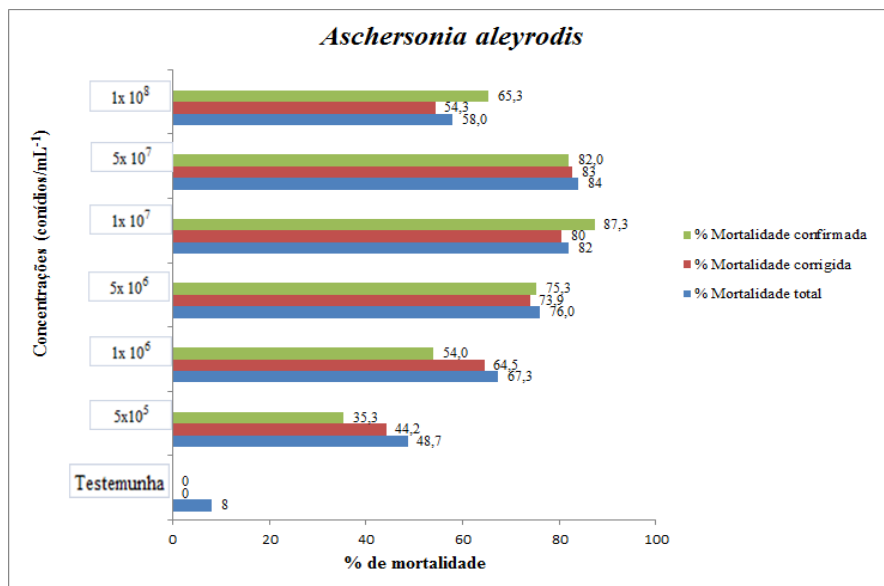
Das seis concentrações testadas de *A. aleyrodis* cinco se mostraram eficientes no controle de mosca negra. Confirmando seu potencial como agente de controle biológico, pois além de causar mortalidades maiores que 40 %, conseguiu estabelecer algum tipo de dano ao inseto em todas as concentrações mencionadas.

Enquanto que *Isaria* sp. mostrou-se eficiente em três das seis concentrações utilizadas. Havendo oscilações entre as concentrações mostrando por vezes que uma concentração menor consegue causar maior percentual de mortalidade em comparação a uma de maior potência. A mortalidade da concentração de 5 x 10⁶ conídios/mL⁻¹ totalizou 59,3 % da mortalidade confirmada e a concentração 1 x 10⁷ conídios/mL⁻¹ apenas 38,7 %, mostrando a eficiência de controle do fungo mesmo quando são utilizadas em menores concentrações de suspensão (Tabela 3). Segundo Boucias e Pendland (1998), a patogenicidade de um fungo varia, dependendo de uma série de fatores, incluindo condições ambientais de baixa umidade ou a presença de compostos aromáticos endógenos da cutícula, que podem agir como agentes anti-fúngicos inibindo a germinação.

Os resultados aqui apresentados mostraram-se contrários aos estudos realizados por Passos (2009), que testando oito isolados de *Isaria* sp., constatou que a maioria desses isolados mostraram-se patogênicos, ocasionando mortalidades acima de 60 % quando utilizado na concentração de 1 x 10⁷ conídios/mL⁻¹. Semelhante aos resultados descritos por Pizzatto (2010), quando testou isolados de *Isaria* sp. sobre a *B. tabaci* resultando na mortalidade confirmada de 98,6 % dos insetos.

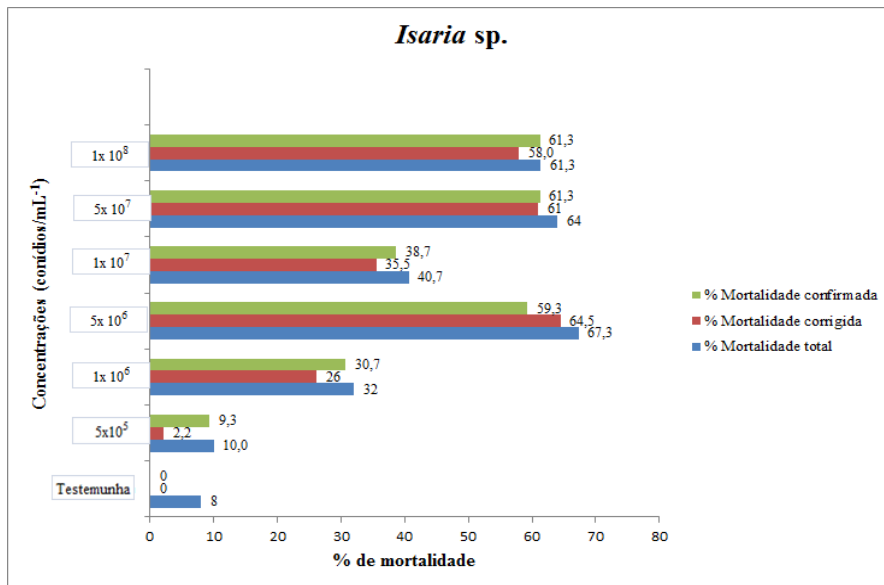
Para o isolado de *A. aleyrodis* os valores de mortalidade corrigida variaram de 44,2 % (obtida na concentração de 5×10^5 conídios/mL⁻¹) a 83 % (obtida na concentração 5×10^7 conídios/mL⁻¹) e a mortalidade confirmada variou entre 35,3 % correspondendo a menor concentração a 80 % obtida na concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹. A mortalidade total apresentou maior valor (87,3 %) na concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹ apresentando diferenças em relação as outras mortalidades conferidas a essa concentração (Figura 9).

Figura 9. Mortalidade total, Mortalidade corrigida e Mortalidade confirmada após 10 dias da pulverização em diferentes concentrações do fungo *Aschersonia aleyrodis*.



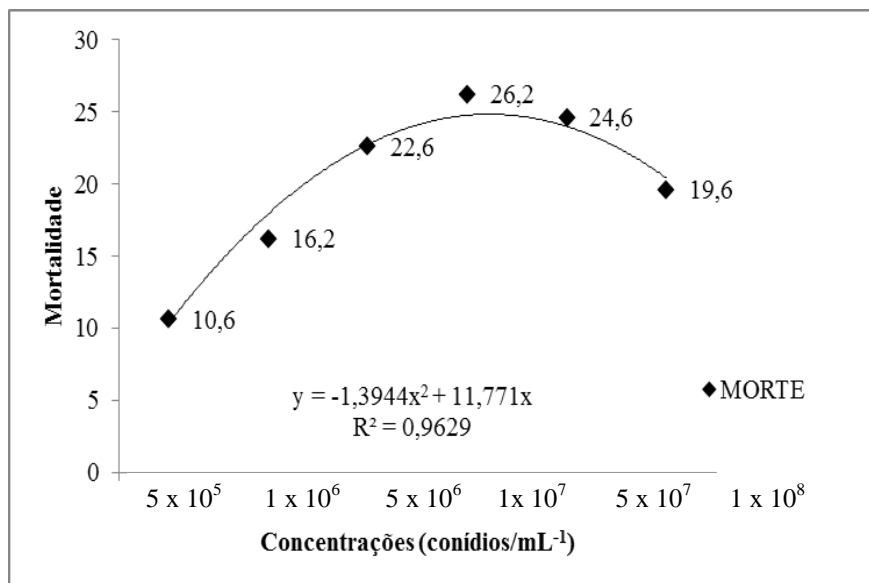
Para o isolado de *Isaria sp.* testado, os maiores valores de mortalidade corrigida e confirmada foram alcançados quando utilizadas as concentrações de 5×10^7 e 1×10^8 conídios/mL⁻¹ (ambas com 61,3 % da mortalidade). O menor valor de mortalidade confirmada foi de 9,3 % correspondendo a menor concentração da suspensão a 5×10^5 conídios/mL⁻¹ (Figura 10). Wright et al. (2001), relatam índices de mortalidade bem maiores que os aqui descritos quando utilizaram o fungo *I. fumosorosea* em concentração de $1,4 \times 10^3$ conídios mm⁻² no controle de *B. tabaci* biótipo B, causando mais de 90 % de controle em ninfas de terceiro ínstar.

Figura10. Mortalidade total, Mortalidade corrigida e Mortalidade confirmada após 10 dias da pulverização em diferentes concentrações do fungo *Isaria* sp.



Os mesmos dados foram submetidos a análise de regressão sendo verificado que existe correlação entre as mortalidades das ninfas de *A. woglumi* e as concentrações empregadas dos dois isolados testados. Sendo que as concentrações de *A. aleyrodis* são responsáveis por 96 % das mortes das ninfas e as concentrações de *Isaria* sp. são responsáveis por 79 % das mortes (Figuras 11 e 12).

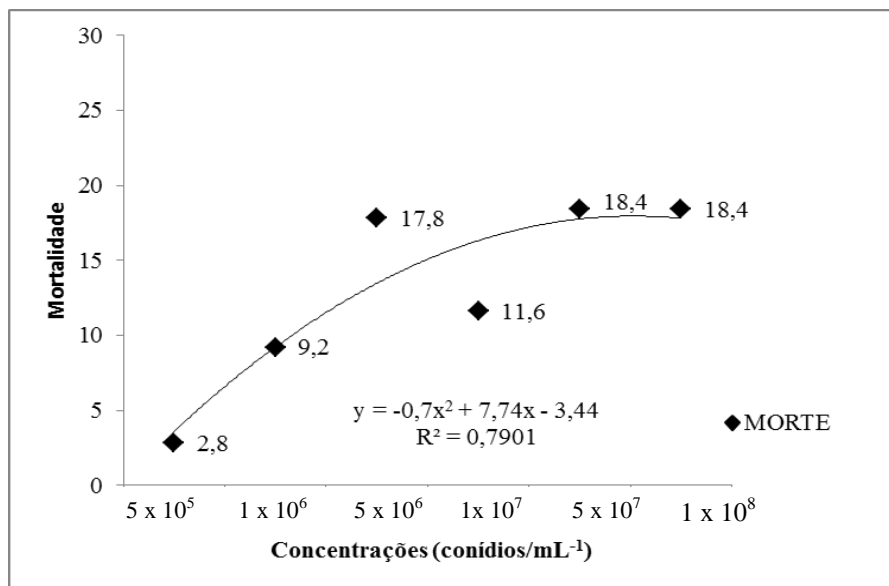
Figura 11. Mortalidade de mosca negra dos citros 10 dias após a aplicação do isolado *Aschersonia aleyrodis* nas concentrações testadas.



Observou-se uma tendência de aumento nas médias de mortalidade de acordo com o aumento das concentrações empregadas, sendo que o pico de mortalidade ocorre quando é utilizada a concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹ (Figura 11). Mesmo esta concentração apresentando percentual de mortalidade maior que as duas concentrações de maior potência, foi verificaram que não houve diferença significativa entre as porcentagens de mortalidade. Sendo que a concentração 5×10^5 conídios/mL⁻¹ controlou em média 10,6 insetos, equivalente a 35,3 % da mortalidade e a concentração 1×10^7 conídios/mL⁻¹ controlou 87,3 %. Pena e silva (2007) verificando que, quando as concentrações de *Aschersonia* sp. são aumentadas, há um aumento significativo no número de ninfas de mosca negra mortas, existindo uma correlação positiva.

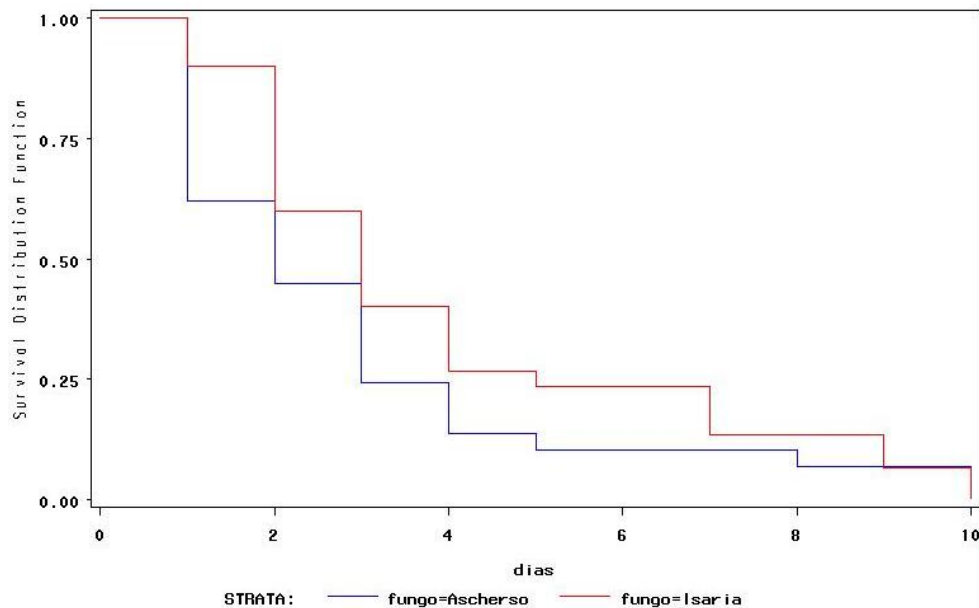
De um modo geral, para o isolado *Isaria* sp. observou-se um incremento significativo na percentagem de mortalidade das ninfas de *A. woglumi* de acordo com o aumento da concentração do fungo. Observa-se na Figura 12, uma tendência de aumento das médias de mortalidade de acordo com o aumento das concentrações, sendo que a concentração 5×10^7 e 1×10^8 conídios/mL⁻¹ controlaram neste tratamento em média 18,4 insetos equivalente a 61,3 % da mortalidade confirmada. Evidenciando que a mortalidade dos insetos apresenta uma correlação positiva com os tratamentos empregados.

Figura 12. Mortalidade de mosca negra dos citros 10 dias após a aplicação do isolado *Isaria* sp. nas concentrações testadas.



Em relação ao tempo letal (TL_{50}), os valores médios de sobrevivência não foram diferentes para os fungos testados, seguindo um mesmo padrão, sendo que para *A. aleyrodis* o Tempo mediano foi de 2 dias e para *Isaria* sp. foi de 3 dias. (Figura 13).

Figura 13. Análise de sobrevivência de ninfas de mosca negra dos citros tratados com os fungos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. em diferentes concentrações avaliados por 10 dias.



Quando se relacionou os dados referentes a mortalidade e sobrevivência calculada, pode-se verificar que os dois isolados se mostraram eficientes no controle da mosca negra, na maioria das concentrações empregadas, ocasionando percentuais expressivos de mortalidade e baixos valores de sobrevivência. Estes resultados corroboram com Passos (2009), que avaliando isolados de *Isaria* sp. na concentração 1×10^7 conídios/mL, demonstrou que o fungo é responsável por 60 % das mortes, apresentando uma sobrevivência média de 2,0 a 3,9 dias.

O tempo mediano referente ao fungo de *A. aleyrodis* apontado neste estudo, é bem menor que o descrito por Pena et al. (2009), que avaliando a inibição do desenvolvimento de *A. woglumi* por *A. aleyrodis* verificou que a TL_{50} para a concentração de $2,3 \times 10^7$ conídios/mL foi de 12,18 (10,91 – 13,59) dias e para $2,3 \times 10^8$ conídios/ml a TL_{50} foi de 9,45 (8,38 – 10,49) dias.

Não foi possível efetuar os cálculos, pelo método de Probit, para determinação da CL_{50} , pois os valores alcançados não foram significativos ao nível de 5% de probabilidade, desta forma para os dois fungos não houve ajuste de modelo matemático.

5 CONCLUSÕES

- O fungo entomopatogênico *Aschersonia aleyrodis* é eficiente no controle da mosca negra dos citros.
- O Meio Completo apresenta as características desejáveis para produção em massa dos fungos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. promovendo alto crescimento micelial, produção e germinação de conídios.
- O fungo *Aschersonia aleyrodis* tem melhor eficiência quando utilizado na concentração de 1×10^7 conídios/mL⁻¹ e *Isaria* sp. nas concentrações de 5×10^7 e 1×10^8 conídios/mL⁻¹.
- A sobrevivência reduzida das ninfas de *Aleurocanthus woglumi* evidencia o potencial de controle dos fungos *Aschersonia aleyrodis* e *Isaria* sp. em curto período de tempo.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**. v.18, p.265-267, 1925.
- AGRIANUAL. 2013. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo. Informa economics/FNP. p. 256-258.
- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2014. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 29 mar. 2014.
- ALMEIDA, F. de A. C.; GOLDFARB, A. C.; GOUVEIA, J. P. G. de. Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus* spp. 1999. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 13-20, 1999.
- ALMEIDA, J. E. M.; MACHADO, L. A. Fungos entomopatogênicos. **Boletim Técnico: Controle Biológico de Insetos e Ácaros**, São Paulo, n. 15, p. 13-27, 2006.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos**. 1998. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 289-381, 1998.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; PEREIRA, R. M.; TAMAI, M. A. **O controle microbiano na América Latina**. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba: FEALQ, Cap.1, p.21-48, 2008.
- ALVES, P. R. B.; MELO, B. **Cultura dos citros**. 2013. Disponível em <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm#3> – Descrição Botânica>. Acesso: abr de 2015.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos. In: ALVES, S. B (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.39-52, 1998.
- ANGELES, N. J.; DEDORDY, J. R.; PAREDES, P. P.; REQUENA, J. R. Mosca prieta (*Aleurocanthus woglumi* Ashby) de los cítricos en Venezuela. **Agronomía Tropical**. Maracay, v. 21, n. 2, p.71-75, Jun., 1972.
- ASSISTAT - **Assistência estatística**. Versão 7,5 beta, 2010.
- AZEVEDO, C. L. L. Embrapa: Sistema de Produção de citros para o nordeste. 2013. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em: 23 de jan. 2014.
- BARBOSA, F. R.; PARANHOS, B. J. Ameaça negra. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**. n.25, abr/maio, 2004.
- BATISTA, T. F. C.; RODRIGUES, R. C.; SOARES, A. C. S.; REIS, J. S.; OHASHI, O. S.; OLIVEIRA, F. C.; LIMA, W. G.; SANTOS, M. M. L. S. Identificação de fungos entomopatogênicos para o controle da mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Homoptera: Aleyrodidae). Praga quarentenária no Brasil. In: XVII

CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2002, Belém. **Anais do Congresso**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. p. 220-220.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. **Principles of insect pathology**. Massachusetts: Kluwer Academic, 550 p, 1998.

CARRILLO, L. Los hongos de los alimentos y forrajes: Estructuras. Universidad Nacional de Salta. 2005. Facultad de Ciencias Agrarias. Disponível em < http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/3_mohos.pdf >. Acesso em: 15 de ago. 2014.

CORREIA, R. G., LIMA, A. C. S., FARIAS, P. R. S., MACIEL, F. C. S., SILVA, M. W. S., SILVA A, G, da. Primeiro registro da ocorrência de mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1915 (Hemiptera: Aleyrodidae) em Roraima. **Revista Agro@ambiente Online**, v. 5, n. 3, p. 245-248, set-dez, 2011

COMITE DE SANIDAD VEGETAL DEL CONE SUR-COSAVE. **Plagas cuarentenarias *Aleurocanthus woglumi*: Hojas de datos sobre organismos cuarentenarios para los países miembros del COSAVE**. 1999. Disponível em: < <http://www.cosave.org.py> > Acesso em: 20 de jan. 2015

CHAPOT, H. **The citrus plant**. In: HÄFLIGER, E. (ed.). Citrus: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p.14-20. 1975.

DIARIO ONLINE. **Indústria tem produção agrícola própria de 130 milhões de caixas de laranja e “esmaga” pequeno citricultor**. Disponível em:<<http://www.odiarionline.com.br/noticia/7809//noticia/7809/>> Acesso em: 12 de abr. 2014.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 de mar. 2012.

FARIA, M. R. de; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos: situação e perspectivas. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, n.22, p.18-21, 2001.

FOLHA AGROECOLÓGICA. **Uso de produtos naturais no combate à mosca-negra**. Pólo Borborema, v. 2, 2011. Disponível em: <http://www.aspta.org.br/wp-content/uploads/2011/05/Usodeprodutosnaturaisnocombateamoscanegra.pdf>. Acesso em: 23 de nov. 2014.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. D.; MONTEIRO, A. C. Influência de meios de cultura utilizados em teste de viabilidade para isolados de *Vermicillium lecanii*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Sincobiol, 8., 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro, SP: FIOCRUZ/UFP/UFRP, 2003.

FRANSEN, J. J.; J. C. VAN LENTEREN. Host selection and survival of the parasitoid *Encarsia formosa* on greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, in the presence of hosts infected with the fungus *Aschersonia aleyrodidis*. **Entomologia Experimental et Applicat.**, v. 69, n.3, p. 239–249, dez.1993.

FREITAS, A. F.; LOUREIRO, E. S. ; ALMEIDA M. E .B. de; PESSOA, L. G. A. Seleção de Isolados de *Metarhizium Anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o Controle de *Mahanarva Fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em Cana-de-Açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.2, p.247-254, 2012.

FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; St. Leger, R. J. EST analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts.. **Microbiology**, v. 149, p. 239–247, 2003.

FRENCH, J. V.; MEAGHER, R. L. Citrus blackfly: chemical control on nursery trees. **Subtropical Plant Science**, Weslaco, v.45, p.7-10, 1992.

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

HADDAD, M. L. Utilização do Pólo-PC para análise de Probit, p.999-1014. In S. B. Alves, **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1163p, 1998.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review Entomology**, v.39, p.293-322, 1994.

HEU, R. A.; NAGAMINE, W. T. Citrus Blackfly *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae). Hawaii Department of Agriculture, Division of Plant Industry, **New Pest Advisory**, v. 99, p.1-3, 2001.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v.111, p. 509-547, 2007.

HSIAO, Y. W.; KO, J. L. Determination of destruxinas, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate an ultraviolet using HPLC method. **Toxicon**, v.39, p, 837 -84, jul, 2001.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. 2013. Sistema de Recuperação Automática–SIDRA.MDisponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/lista.asp/?c=1613&z=o=>>. Acesso em: 20 de abr. 2014.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2012. Produção agrícola municipal. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 de abr. 2015.

IMPERATO, R. **Incidência de Mosca-Negra-dos-Citros *Aleurocanthus Woglumi*, Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) em duas espécies cítricas na região centro-leste do Estado de São Paulo: Dinâmica Populacional, Aleirodídeos Associados, Diversidade de Parasitoides (Hymenoptera), Influência dos Fatores Abióticos e Aspectos Nutricionais**. 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Vegetal e Segurança Alimentar no Agronegócio) – Instituto Biológico, Campinas, 2014.

JORDÃO, A. L; R. A SILVA. **Guia de Pragas Agrícolas para o Manejo Integrado no Estado do Amapá**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 182p, 2006.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 92 p, 2003.

LEMOS, R. N.S; SILVA, G. S.; ARAÚJO, J. R. G.; CHAGAS, E. F.; MOREIRA, A. A.; SOARES, A. T. M. Ocorrência de *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) no Maranhão. **Neotropical Entomology**, v.35, p. 558-559, 2006.

LIU, M.; CHAVERRI, P.; HODGE, K. A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia*, its allies with white stromata and their *Hypocrella* sexual states. **Mycological Research**, v.110, n.5, p.537-554, 2006.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C. de; COSTA, F. R.; BORGES, J. A. M. **Mosca-Negra-dos-Citros (*Aleurocanthus woglumi* Ashby) (Hemiptera: Aleyrodidae) Chega à Paraíba**. Relatório Técnico-Fitossanitário. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A. Estação Experimental de Lagoa Seca, 2009.

LOPES, E. B.; BRITO, C. H. de; BATISTA, J. de L.; SILVA, A. B. D. A. Ocorrência da mosca-negra-dos-citros (*Aleurocanthus woglumi*) na Paraíba. **Revista Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, p.19-22, 2010.

LOPES, G. da S.; LEMOS, R. N. S. de.; ARAÚJO, J. R. G.; MARQUES, L. J. P.; VIERIA, D. L. Preferência para oviposição e ciclo de vida de mosca-negra- dos-citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby em espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 738-745, Sept. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452013000300010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Abr. 2015.

LOURENÇÃO, A. L.; YUKI, V. A.; ALVES, S. B. Epizootia de *Aschersonia cf goldiana* em *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biótipo B no Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.2, p.343-345, 1999.

MACHADO, K. K. G.; LEMOS, R. N. S.; PEREIRA, C. F. M.; MEDEIROS, F.R.; ARAUJO, J. R. G.; COSTA, V. A. Ocorrência de inimigos naturais da mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) em culturas hospedeiras no Estado do Maranhão. **In: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2012, Curitiba. CD de Resumo do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. Londrina: Sociedade Entomológica do Brasil, 2012.

MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2005. 87p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005.

MAIA, W. J. M. S.; MAIA, T. J. A. F.; MENDONÇA, D. M.; LEÃO, T. A. de. C.; PINHEIRO, S. J. L.; OLIVEIRA, A. S. S. de. Diversidade da entomofauna de inimigos naturais de *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), nos municípios de paraenses de Belém, Capitão Poço e Irituia. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**. Gramado/RS. 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual para controle da mosca negra dos citros (*Aleurocanthus woglumi*)**. 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 23 de fev. 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2011. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 de abril 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de pragas quarentenárias presentes (A2).X2014.h** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 16 abr. 2014.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p.1675-1680, 2004.

MARTÍNEZ, N. B; TERÁN, J. B. GERAUD, F. Enemigos Naturales de la Mosca Prieta de Los Cítricos *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae) en Venezuela. **Agronomía Tropical**, v. 29, p. 453-458, 1979.

MARTINEZ, S. S. **O nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. 2.ed. Londrina: IAPAR, 2011. 205 p.

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian archives of biology and technology**, vol.53, n.4, p. 753-761, 2010.

MEEKS, E. T. M.; VAN-VOORST, S.; JOOSTEN, N. N.; FRANSEN, J. J.; VAN-LENTEREN, J.C. Persistence of the fungal whitefly pathogen, *Aschersonia aleyrodis*, on three different plant species. **Mycological Research**, v.104, n.10, p.1234-1240, 2000.

MEEKES, E. T. M.; FRANSEN, J. J.; VAN-LENTEREN, J. C. Pathogenicity of *Aschersonia* spp. Against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.81, n.1, p.1-11, 2002.

MENDONÇA, D. C.; LEÃO, T. A. C.; PINHEIRO, S. J. L.; OLIVEIRA, A. S. S.; MAIA, W. J. M. S. Levantamento da entomofauna de inimigos naturais da mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), no município de Capitão Poço/PA. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado/RS, 2004.

MONTEIRO, B. M.; RODRIGUES, K. C. V.; SILVA, A. G.da.; BARROS, R. Ocorrência da mosca-negra-dos-citros (*Aleurocanthus woglumi* Ashby) (Hemiptera: Aleyrodidae) em Pernambuco. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 173-176, mar./ jun., 2012.

MURAKAMI, L. F.; TOSCANO, L. C.; BARDIVIESSO, E. M.; DIAS, P. M.; MARUYAMA, W. I.; BARDIVIESSO, D. M. Concentrações e Formulações de Nim (*Azadirachta indica*) no Controle de *Bemisia tabaci* Biótipo B na Cultura do Algodoeiro. **Cadernos de Agroecologia**, v.9, n. 4, Nov 2014.

NEVES, M. F. (Org.). **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p.

NGUYEN, R.; HAMON, A. B. **Citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae)**. Gainesville: University of Florida, n. 360, 3 p, 2003.

NGUYEN, R., BRAZZEL J.R.; POUCHER, C. Population density of the citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae), and its parasites in urban Florida in 1979-81. **Environmental Entomology**, v. 12, p. 878-884, 1983.

OLIVEIRA, I. M. de. **Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp cultivado em diferentes meios de cultura**. 2008. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

OLIVEIRA, J. T. M. DE; BONALDO, S. M.; TRENTO, R. A. Desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. e isolado de Teca em diferentes meios de Cultura. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n. 13, p.1329, 2011.

OLIVEIRA, M. R. V.; SILVA, C. C. A. da; NAVIA, D. Praga Quarentenária A1: A mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae). EMBRAPA – **Comunicado Técnico 40**, 7p, 1999.

OLIVEIRA, M. R. V.; SILVA, C.C.A.; NÁVIA, D. **Mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi*: Alerta quarentenário**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 12 p, 2001b.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; BORGES, R. de SÁ; NAKASU, B. H. **Mudas de citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 32p, 2001a.

PAMPOLINI, J. ; D'ALESSANDRO, C.; DELALIBERA, J. I. Avaliação do Desenvolvimento de *Isaria fumosorosea* em diferentes meios de cultura. 2012. Disponível em:<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2234&numeroEdicao=20> > Acesso em: 23 de abr 2015.

PASSOS, E. M. dos. **Patogenicidade de Fungos do Gênero *Isaria* (Persoon) sobre *Coptotermes Gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae) e Aspectos Imunológicos**. 2009. 55f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco. 2009.

PENA, M. R.; SILVA, N. M. **Sugadora Negra**. In: Revista Cultivar: Hortaliças e Frutas. Pelotas/RS, Ano VII, n. 41, p.16-18, 2007.

PENA, M. R.; SILVA, N. M. DA ; BENTES, J. L. S.; ALVES, S. B.; BEZERRA, J. L. S.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L.; HUMBER, R. A. **Inibição do desenvolvimento de *Aleurocanthus woglumi* ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) por *Aschersonia* cf. *Aleyrodia webber* (Deuteromycotina: Hyphomycetes)**. Arquivos do Instituto Biológico ., São Paulo, v.76, n.4, p.619-625, 2009.

PENA, M. R.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENCAO, A. L.; SILVA, N. M. ; YAMAMOTO, P. T.; GONCALVES, M. S. Ocorrência da mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby(Hemiptera: Aleyrodidae) no estado de São Paulo. **Revista de Agricultura**(Piracicaba), v.83, p. 61-65, 2008.

PIZZATTO, M.; POTRICH, M.; ROMAN, J. C.; LUCKMANN, D.; SILVA, E. R. L. da GOUVEA, A. Desenvolvimento vegetativo de fungos entomopatogênicos e patogenicidade a *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). 2010. Disponível em: <<http://revistas.utfpr.edu.br/dv/index.php/SSPA/article/download/453/225>>. Acesso em: jan. 2015

POTRICH, M.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, L. F. A.; PIZZATTO, M.; SILVA, E. R. L. DA. LUCKMANN, D.; GOUVEA, A. DE; ROMAN, J. C. Virulência de fungos entomopatogênicos a ninfas de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1783-1792, 2011.

PROSA RURAL. **Combate da mosca-negra-dos-citros sem o uso de agrotóxico**. Disponível em:< [https:// www .embrapa.br/informacao-tecnologica](https://www.embrapa.br/informacao-tecnologica)> Acesso em: 01 nov. 2014.

QUEIROZ, A. R. S. de; TELES, B. L. Utilização de crisopídeos (neuroptera) no controle da mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi* ASHBY (Hemiptera: Aleyrodidae) no município de Manaus, AM. **Anais/ resumo da 61ª Reunião Anual do sbpc**, 2009, Manaus. Disponível em:< <http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/>>. Acesso em: jan 2015.

RAGA, A.; V. A COSTA, 2008. **Mosca negra dos citros**. Instituto Biológico - APTA. Documento Técnico – 1. 9 p. Disponível em: <<http://www.biological.sp.gov.br>>. Acesso em: 01 out. 2014.

RHEINHEIMER, L. M.; CHAVERRI, P.; HODGE, K. A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia*, its allies with white stromata and their *Hypocrella* sexual states. **Mycological Research**.v.2, p.537-554, 2006.

ROJAS, T. *Aschersonia basicystis* sobre insectos escamas (Homoptera: Coccidae) en Venezuela. **Revista Iberoamericana Micología**, v.17, p.134-137, 2000.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, n.6, p. 120, 1974.

SANTORO, P. H; NEVES, P. M. O. J.; ALEXANDRE, T. M.; ALVES, F. L. A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.4, p.483-489, 2007.

SAS System, the. Version 8.2. Cary: SAS Institute, 2001. 6 CD-ROM. Windows 98.

SCORSETTI, A. C.; HUMBER, R. A.; DE GREGÓRIO, C. e L. LASTRA, C. C. L. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* pests of horticultural crops in Argentina. **Bio Control**, v.53, p. 787-796, 2008.

SILVA, J. G.; BATISTA, J. L.; SILVA, J. G.; BRITO, C. H. Use of vegetable oils in the control of the citrus black fly, *Aleurocanthus woglumi* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 38, n. 2, p. 182-186, 2012.

SILVA, K. F. A. S.; MICHERREEF FILHO, M.; SILVA, J. B. T.; MARTINS, I. ISAIAS, C. O.; RESENDE, R. F. V.; BARBOZA, E. A.; MELLO, S. C. M. **Dinâmica populacional de**

fungos benéficos em Solos nos sistemas de cultivo convencional e orgânico de morangueiro. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 5p (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 60).

SILVA, L. B.; PENA, M. R.; RONCHITELES, B. Avaliação do efeito de diferentes inóculos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre ovos e ninfas da mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* sobre (hemiptera: aleyrodidae) em laboratório. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC INPA CNPQ/FAPEAM, 2010, Manaus. **Anais...Manaus. XIX CNPQ/FAPEAM**, p.1-4, 2010

SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura.** FAPESP CITROS. p.433-435, 1998.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; ALVES, S. B. Caracterización de una vez aislamiento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Eu Estandarización, virulência y actividade enzimática. CIRPON. **Revista de Investigación**, v.1, p.83-101, 1983.

SPECHT, A.; AZEVEDO, J. L.; LIMA, E. A. L. A.; BOLDO, J. T.; MARTINS, M. K.; LORINI, L. M.; BARROS, N. M. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi, Sordariomycetes) em lagartas de *Lononia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, n.3, p.493-494, 2009.

TAVARES, A. P. M.; SALLES, R. F. de M.; OBRZUT, V. V. Efeito ovicida de nim, citronela e sassafrás sobre a mosca branca *Bemisia* spp. **Revista Acadêmica Ciência Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 153- 159, 2010.

VIEIRA, D. L.; SOUZA, G. M. M. de; OLIVEIRA, R. de; BARBOSA, V. de O.; BATISTA, J. de L.; PEREIRA, W. E. Aplicação de Óleos Comerciais no Controle Ovicida de *Aleurocanthus Woglumi* ASBHY. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1126-1129, Sept./Oct., 2013.

VITAL, R. C. de J.; MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; DELALIBERA JR, I. Virulência de fungos entomopatogênicos a ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 998 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão).

VITAL, R. C. de J.; QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; LIMA, J. F. dos S. 2014. Patogenicidade de *Isaria* spp. a ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B. In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014, Goiás. CD de Resumo do XXV Congresso Brasileiro de Entomologia. Goiás: Sociedade Entomológica do Brasil, 2014.

WANG, P.; SONG, X.; ZHANG, H. Isolation and characterization of *Aschersonia placenta* from citrus orchards and its pathogenicity towards *Dialeurodes citri* (Ashmead). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 12, n. 2, p.122–128, 2013.

WRAIGHT, S. P.; JACKSON, M. A.; KOCK S. L. **Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents.** In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds), Fungi as Biocontrol Agents. CAB International, United Kingdom, p. 253–287, 2001.

YIP, H. Y.; RATH, A. C.; KOEN, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabeidae). **Mycological Research**. v. 96, n.2, p 92-96, 1993.