

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ação e transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879)  
(Hypocreales, Clavicipitaceae) em adultos de *Musca domestica* Linnaeus, 1758  
(Diptera, Muscidae), em laboratório

Francielly Felchicher

Pelotas, 2010

Francielly Felchicher

Ação e transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879)  
(Hypocreales, Clavicipitaceae) em adultos de *Musca domestica* Linnaeus, 1758  
(Diptera, Muscidae), em laboratório

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de  
Pelotas como requisito parcial à obtenção  
do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientador: Paulo Bretanha Ribeiro

Pelotas, 2010

**Dados de catalogação na fonte:**

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F288a Felchicher, Francielly

Ação e transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) (Hypocreales Clavicipitaceae) em adultos de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae), em laboratório / Francielly Felchicher. – 29f. – Monografia (Conclusão de curso). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2010. – Orientador Paulo Bretanha Ribeiro.

1.Biologia. 2.Parasitologia. 3.Controle biológico.  
4.Diptera. 5.Entomopatogênico. 6.Fungo. 7. *Musca* I.Ribeiro,  
Paulo Bretanha. II.Título

CDD: 595.77

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Paulo Bretanha Ribeiro

Dra. Cristine Ramos Zimmer

Msc. Marcial Corrêa Cárcamo

Dr. Eduardo Bernardi

## **Agradecimentos**

A minha mãe e meu pai devo tudo que sou e o que consegui conquistar na vida. Vocês são os culpados por essa pessoa que me tornei (e dizem que sou uma pessoa de grande coração). Agradeço por todo amor e paciência, suportando por longos anos essa filha que é sempre a “do contra”. Meus pais são os amores da minha vida, os exemplos de vida, de força que sigo.

Aos meus irmãos, por me ajudarem sempre a organizar meus pensamentos, tantas vezes confusos. As nossas brigas intermináveis, as greves de fome para tentar mudar as coisas lá em casa. Bia, minha irmã, minha amiga, que mesmo distante, ouve todas minhas histórias, me dando conselhos (que nem sempre sigo), obrigada por me tirar de casa inúmeras vezes e não me deixar mofando, um dia terei um décimo da coragem que tens pra encarar o mundo. Junior, meu irmão mais novo, também meu melhor amigo (mais que o Sig), me acompanhando por todo esse tempo (tem gente que fala que um dia a gente ainda se mata), sempre me fazendo voltar ao mundo real com toda sua psicologia para crianças. Obrigada por conviverem com minha “rebelia sem causa”, amo vocês!

Minha madrinha Cineide, exemplo de vida, de superação, mesmo ausente há um tempo, lembro de ti a todo instante. Tu eras a única pessoa que, no início, me ouvia falando da Biologia, do “fedor”, por horas, sem questionar, e me dizendo para seguir, que daria tudo certo, pois dizia que eu falava sempre com brilho nos olhos.

Ao meu orientador Bretanha, por ser esse ótimo educador, aconselhando sempre a continuarmos estudando e nos mostrando os caminhos a seguir.

Ao parceiro de trabalho Marcial, não fosse pela tua parceria, pela cobrança e milhares de conselhos eu não teria feito sequer esse trabalho.

Aos colegas Jucelio e Eduardo, obrigada pela força nesse trabalho e parceria em tantos outros.

A todos os professores, colegas e amigos do Laboratório de Biologia e Taxonomia de Insetos, Bretanha, Marcial, Élvia, Jucelio, Cris, Dani, Juliano, Eduardo, Camila, Ândrio, Ademir, Rodrigo, Rosi, e aos demais, obrigada pelas horas de conversa nos intervalos, enquanto bebíamos milhares de litros de café e mate.

Aos professores e aos educadores que nos ensinaram muito na UFPel, obrigada pela dedicação e paciência durante esse tempo que passamos na faculdade.

As minhas amigas e amigos não tenho como agradecer pelos ótimos momentos, eu me esforço, mas nunca será o suficiente para retribuir a amizade, o amor que demonstram a todo momento. Vocês ajudaram a fazer esse tempo na faculdade, parte da minha vida, ser maravilhoso, com todas nossas festas, estudos, jantares, conversas, confissões, aventuras, shows, viagens. Nossa!!! Como é bom lembrar tudo que vivemos (engraçado descobrir agora que vocês acharam, por um momento, que eu iria surtar).

Agradeço com minha mais sincera amizade e amor, a um seleto grupo de pessoas, que considero minha família longe de casa: Aryse minha “maíinha”, uma irmã de coração, me adotou e me coloca rédeas. Tu suportas a parte louca da família, corajosa tu; Bruna uma filósofa, adoro ouvir tuas teorias, viajamos falando mil assuntos ao mesmo tempo. Tão novinha e com uma experiência profissional que

poucos terão; Dini com tua música, tuas composições, me fazendo chorar ao te ouvir cantando, obrigada pelos conselhos sábios; Elisa é minha parceria para qualquer hora (com chuva ou mais chuva ainda), sinuca, congressos, shows e Madonna... Saiba que se for te jogar da ponte e me convidar estarei do teu lado; A Helen eu agradeço por me fazer voltar a enxergar bem mais longe, me mostrar que planos para o futuro existem e que podem ser executados ao lado das pessoas que amo; Luísa, como nós choramos! É uma competição? Agradeço a ti toda paciência ao lidar comigo, pelas vezes que suportou essa pessoa “dedão destroncado” que sou. Não sei como tu me perdoou ainda... A Monique, uma pessoa fácil de conviver, me ouvindo filosofar e parecendo que está tudo certo para ela, sempre me dando corda para falar mais, desabafar. O Jeferson que tinha medo de mim nos primeiros semestres (até hoje rio sozinha quando lembro). É um exemplo de dedicação a Biologia, parceiro e sinuca e bares. Sig, inseparável, desde que tu surgiste minha loucura foi comprovada!

A todos que dividiram comigo momentos diversos na faculdade, Camila, Maiara, Ricardo, Leo, Igor, Rômulo, Melina, Mari e Mari, Elitinha, Simone, Isadora, Camilinha, Fernanda, Fernando, Sibeli, Cássia, Gabriel, Anelize, Maraísa, Thaíse, Drika, Edinho,... Seja em questões acadêmicas, momentos de descontração nas partidas de sinuca... Obrigada pela amizade.

## Resumo

FELCHICHER, Francielly. **Ação e transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) (Hypocreales, Clavicipitaceae) em adultos de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae), em laboratório.** 2010. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Entre os dípteros muscóides a *Musca domestica* possui elevada importância em saúde pública e sanidade animal, pois são veiculadores de diversos patógenos além de causarem incômodo às populações humanas e de outros animais. Uma alternativa de controle desses dípteros está no uso de seus inimigos naturais, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. A contaminação destes insetos por fungos pode ocorrer de diversas maneiras, dentre elas, a transmissão horizontal. A compreensão da carga patogênica necessária para causar mortalidade em cada espécie de inseto, assim como, as formas de infecção efetivas são de grande importância para se estabelecer um plano de controle das populações de insetos. Este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto de *M. anisopliae* sobre a sobrevivência dos adultos de *M. domestica*, além da ocorrência de transmissão horizontal entre estes. Foi realizada avaliação da carga patogênica de *M. anisopliae* em suspensão nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Foram realizados outros dois bioensaios, sendo um para a avaliação da transmissão horizontal de *M. anisopliae* em função do tempo decorrido de infecção (0, 24, 48, 72 e 96h) de adultos de *M. domestica*, e outro para a verificação da transmissão horizontal de fêmeas para machos e de machos para fêmeas. O fungo *M. anisopliae* é patogênico para adultos de *M. domestica*, e a sobrevivência desse díptero diminui conforme o aumento da concentração de conídios usada. As concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> apresentaram redução significativa na sobrevivência de adultos de *M. domestica*. A transmissão horizontal de *M. anisopliae* ocorre em adultos de *M. domestica*, 100% das fêmeas e machos sadios expostos, respectivamente, a machos e fêmeas previamente infectados, apresentaram germinação de *M. anisopliae*. O período de infecção dos adultos *M. domestica* influenciou na germinação de *M. anisopliae*.

Palavras-chave: Controle biológico. Diptera. Entomopatogênico. Fungo. *Musca*.

## Abstract

FELCHICHER, Francielly. **Action and horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) (Hypocreales, Clavicipitaceae) in adults of *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae) in laboratory.** 2010. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Among muscoid flies *Musca domestica* has a high importance to public health and animal health because they are backers of many pathogens besides causing nuisance to humans and other animals. An alternative for control of house flies is the use of natural enemies, such as the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Contamination of insects by fungi can occur in several ways, among them, the horizontal transmission. The understanding of the pathogenic load required to cause mortality in each insect species, as well as effective forms of infection are of great importance to establish a plan to control insect populations. This study aimed to evaluate the impact of *M. anisopliae* on the survival of adult *M. domestica*, besides the occurrence of horizontal transmission between them. Evaluations were performed on pathogen load in suspension of *M. anisopliae* at concentrations of  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>. Other two bioassays were conducted, one for the assessment of horizontal transmission of *M. anisopliae* as a function of elapsed time of infection (0, 24, 48, 72 and 96h) in adult of *M. domestica*, and one for verification of horizontal transmission from females to males and females to males. The fungus *M. anisopliae* are pathogenic to adults of *M. domestica*, and this will decrease the survival with increasing concentration of spores used. The concentrations of  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup> showed significant reduction in survival of adult *M. domestica*. Horizontal transmission of *M. anisopliae* occurs in adults of *M. domestica*, 100% of healthy females and males exposed, respectively, males and females previously infected showed germination of *M. anisopliae*. The infection period of adults of *M. domestica* influenced the germination of *M. anisopliae*.

Keywords: Biological control. Diptera. Entomopathogenic. Fungus. *Musca*.



## Lista de Figuras

- Figura 1 Curva de sobrevivência de adultos de *Musca domestica* em função do tempo (dias) frente a diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* em condições de laboratório (25°C, UR> 70% e fotofase de 12h). A= tratamento controle; B, C, D e E= tratamento com suspensão fúngica nas concentrações de 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>, respectivamente..... 20
- Figura 2 Curva de sobrevivência de adultos de *Musca domestica* em função do tempo (dias) para machos e fêmeas expostos a suspensão de *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10<sup>7</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>, em condições de laboratório (25°C, UR> 70% e fotofase de 12h). Sendo f e m, tratamentos controle; ff e fm, tratamentos com suspensão fúngica..... 22
- Figura 3 Frequência de germinação do fungo *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica* em função do tempo (horas) de contaminação de fêmeas (f) e machos (m), em condições de laboratório (25°C, UR> 70% e fotofase de 12h)..... 24

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Mortalidade acumulada para adultos de <i>Musca domestica</i> , durante 10 dias, em função da ação das diferentes concentrações de suspensão de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	21
Tabela 2	Influência do tempo de infecção de machos e fêmeas de <i>Musca domestica</i> sobre a transmissão genérica cruzada, de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	25

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Revisão da literatura.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 <i>Musca domestica</i> Linnaeus, 1758 (Diptera; Muscidae) .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Fungos entomopatogênicos .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Transmissão horizontal .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1 Coleta, manutenção e multiplicação de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2 Aquisição, manutenção e multiplicação de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Ação de diferentes concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre adultos de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>4.4 Transmissão horizontal de <i>Metarhizium anisopliae</i> em adultos de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>4.5 Influência do período de infecção na transmissão horizontal de <i>Metarhizium anisopliae</i> em adultos de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Ação de diferentes concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre adultos de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Transmissão horizontal de <i>Metarhizium anisopliae</i> em adultos de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>5.3 Influência do período de infecção na transmissão horizontal de <i>Metarhizium anisopliae</i> em adultos de <i>Musca domestica</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>26</b>
<b>Referências.....</b>	<b>27</b>

## 1 Introdução

A importância dos dípteros muscóides na saúde humana e animal é bastante ressaltada na literatura, pois além de causar incômodos são hospedeiros de vários helmintos (TRAVERSA et al., 2008) e vetores mecânicos de diversos vírus (TAN; YAP; LEE, 1997), bactérias (OLIVEIRA et al., 2006), fungos (CAFARCHIA et al., 2009) e protozoários (GRACZYK; KNIGHT; TAMANG, 2005).

Entre os muscóides, *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera; Muscidae) é uma das espécies mais conhecidas como tendo importância econômica, na saúde humana e de outros animais (MARICONI; GUIMARÃES; BERTI FILHO, 1999).

Devido à importância deste inseto em agroecossistemas e áreas urbanas o seu controle se faz necessário. Este por sua vez é geralmente feito com o uso de inseticidas químicos, mas esta forma de controle apresenta alguns problemas, como: poluição ambiental, intoxicação de humanos, animais domésticos e de produção, além do aparecimento de resistência nas populações de insetos (PARRA, 2002).

A utilização de fungos entomopatogênicos se mostra uma importante alternativa para a diminuição das populações de *M. domestica*. Existem relatos de pelo menos sete fungos entomopatogênicos com ação sobre *M. domestica*, são eles: *Entomophthora muscae* (KRASNOFFA, 1995), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria brogniartii* (Sacc.) Petch 1926 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm. 1957, *Tolyocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycetes, Moniliaceae), *Verticillium lecanii* (Deuteromicotina: Hyphomycetes) (Zimm) (BARSON; RENN; BYWATE, 1994). Estes autores ainda ressaltam que *M. anisopliae* é a espécie com maior impacto sobre larvas e adultos deste díptero.

O fungo utilizado em maior escala para controle biológico no Brasil é *M. anisopliae* (FARIA; MAGALHÃES, 2001). Apesar de reconhecidamente entomopatogênico a ação deste fungo, assim como a maioria dos patógenos, depende da quantidade de inóculo a qual o hospedeiro é exposto (BERNARDI et al., 2006). A carga patogênica deve ser estudada pela sua especificidade, levando em consideração a espécie alvo, cepa do fungo e formas de infecção.

A infecção de insetos por *M. anisopliae* pode ser dar diretamente do solo, pois este é o reservatório natural de fungos que infectam insetos (LANZA; MONTEIRO; MALHEIROS, 2004). Pode se dar também pelo uso de suspensões de conídios, segundo Magalhães, Faria e Frazão (1997) as formulações podem ser aquosas ou oleosas, mantendo alta taxa de germinação. Outra forma é a transmissão horizontal que pode ocorrer de insetos mortos para insetos vivos (QUESADA-MORAGA et al., 2004) e também entre insetos vivos (SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2004).

A compreensão da carga patogênica necessária para causar mortalidade em cada espécie de inseto, assim como, as formas de infecção efetivas são de grande importância para se estabelecer um plano de controle das populações de insetos.

## **2 Objetivo**

Analisar a ação e transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica*

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o impacto de diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Musca domestica*
- Verificar a transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica*
- Analisar a influência do período de infecção na transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica*

### 3 Revisão de Literatura

#### 3.1 *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera; Muscidae)

As modificações feitas pelo homem no ambiente, a domesticação de animais, elevada urbanização, e acúmulo de matéria orgânica em decomposição, proporcionam aos insetos sinantrópicos condições para sua sobrevivência e reprodução (ROBINSON, 1996).

Os dípteros muscóides, dentre eles representantes da família Muscidae, além de causar incômodo são hospedeiros de vários helmintos (TRAVERSA et al., 2008) e possuem elevado potencial como vetores mecânicos de agentes etiológicos como vírus (TAN; YAP; LEE, 1997), fungos (CAFARCHIA et al., 2009), bactérias (OLIVEIRA et al., 2006), cistos de protozoários (GRACZYK; KNIGHT; TAMANG, 2005) e ovos de helmintos (MARICONI; GUIMARÃES; BERTI FILHO, 1999).

Dentre os dípteros de maior importância sanitária e econômica encontra-se a *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae), espécie com distribuição geográfica mundial, alto índice de sinantropia e endofilia, estando constantemente presente em residências, tanto em ambientes urbanos quanto em agroecossistemas, invadindo em grandes quantidades chiqueiros, galinheiros e currais (MARICONI; GUIMARÃES; BERTI FILHO, 1999; NEVES, 2005). A presença desta espécie é muito dependente das condições sanitárias existentes, ocorrendo em elevada quantidade quando existe um precário serviço de coleta de lixo e falha no tratamento de fezes de animais (NEVES, 2005).

A veiculação de patógenos por *M. domestica* se dá pela regurgitação alimentar, veiculação de patógenos aderidos às pernas e às cerdas do corpo, além de ser hospedeira intermediária de alguns helmintos (NEVES, 2005).

Devido à importância deste inseto em agroecossistemas e áreas urbanas o seu controle se faz necessário. O controle de moscas, de um modo geral, é ainda realizado pelo uso exclusivo de praguicidas, que podem provocar o desenvolvimento da resistência aos inseticidas químicos e impactar o ambiente, contaminando o solo, a água e os alimentos (PRADO, 2003).

### 3.2 Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos são os organismos que mais causam doenças em insetos, com aproximadamente 750 espécies conhecidas que infectam artrópodes (GULLAN; CRANSTON, 2007). Fungos são capazes de infectar insetos, por penetrar a cutícula em diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos (ALVES et al., 1998).

Se comparados com outros grupos de patógenos, os fungos possuem certa vantagem, pois a maioria deles é altamente especializada na penetração via tegumento do inseto, diferente de outros patógenos que só penetram nos insetos pela via oral (MELO et al., 2007).

Os esporos dos fungos entram em contato com o inseto, germinam, produzem hifas que penetram na cutícula, invadindo a hemocele e causando a morte pela liberação de toxinas (GULLAN; CRANSTON, 2007).

Existem pelo menos sete fungos entomopatogênicos com ação sobre *M. domestica*, são eles: *Entomophthora muscae* (KRASNOFFA, 1995), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria brogniartii* (Sacc.) Petch 1926 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm. 1957, *Tolypocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycetes, Moniliaceae), *Verticillium lecanii* (Deuteromicotina: Hyphomycetes) (Zimm) (BARSON; RENN; BYWATE, 1994).

Dentre os fungos mais usados para o controle de insetos no Brasil encontra-se o *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) (Hypocreales, Clavicipitaceae), conhecido como muscardina verde, que apresenta um grande número de hospedeiros, infectando mais de 300 insetos de diferentes ordens (ALVES et al., 1998). O solo é o reservatório natural de fungos que infectam insetos, como o *M. anisopliae*, também é o local onde o fungo sobrevive por longos períodos (LANZA; MONTEIRO; MALHEIROS, 2004).



### 3.3 Transmissão horizontal

A contaminação de insetos por fungos pode ocorrer de várias formas, dentre elas está a transmissão horizontal, que consiste na transmissão de um fungo de um inseto contaminado para outro inseto (não descendente) (ROY et. al., 2006). A transmissão horizontal pode ocorrer de insetos mortos para insetos vivos (QUESADA-MORAGA et al., 2004) e também entre insetos vivos (SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2004).

A transmissão horizontal é descrita para diversas ordens de insetos. Scholte, Knols e Takken (2004) demonstraram que a transmissão horizontal, durante atividade de acasalamento, ocorre em mosquitos. A transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* ocorre em *Musca domestica*, de adultos mortos e contaminados para adultos vivos (RENN; BYWATER; BARSON, 1999). Quesada-Moraga et al. (2008) citam a transmissão horizontal de *M. anisopliae* ocorrendo em adultos de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Além dos dípteros a transmissão horizontal de *M. anisopliae* é relatada em *Blattella germanica* (L.) (Blattaria, Blattellidae) (Quesada-moraga et. al., 2004).

## **4 Metodologia**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Insetos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS.

### **4.1 Coleta, manutenção e multiplicação de *Musca domestica***

Foram coletados adultos de *Musca domestica* no campus Capão do Leão (31°48'S, 52°25'O) da Universidade Federal de Pelotas e levados para o Laboratório de Biologia de Insetos (IB-UFPel), onde foram mantidos em câmara climatizada (25°C, UR 70% ± 10% e fotofase de 12h), a partir da qual foi iniciada a criação de *M. domestica*, sendo estas mantidas conforme a metodologia usada por Ribeiro et al. (2000).

### **4.2 Aquisição, manutenção e multiplicação de *Metarhizium anisopliae***

O isolado fúngico de *Metarhizium anisopliae* (CG34) é proveniente da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tendo sido isolado de *Conotrachelus* sp. (Coleoptera, Curculionidae) em Manaus/AM (1988).

O isolado foi mantido sob refrigeração (3°C ± 2°C) em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) e foram repicados para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo sendo em seguida incubados em estufa a 25° C com fotoperíodo de 12h. Após a esporulação das culturas as suspensões foram realizadas utilizando água destilada estéril adicionada de espalhante adesivo (Tween 80) na proporção de 0,01%. As concentrações utilizadas nas diferentes

partes do experimento foram elaboradas utilizando uma câmara de Neubauer para a contagem de conídios.

#### **4.3 Ação de diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Musca domestica***

Foram testadas quatro concentrações de suspensões fúngicas, sendo elas:  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>, essas foram produzidas da maneira supracitada. Para cada concentração foram testados 45 casais de *Musca domestica*, sendo divididos em três réplicas de 15 casais, foram realizadas três réplicas sem a presença de conídios, que serviu como grupo testemunha. Foram utilizados adultos com quatro dias, sendo que estes foram sexados e separados logo após a emergência e só foram colocados na mesma caixa telada após os tratamentos.

Cada espécime foi submerso em 1mL de suspensão durante um segundo, e logo após colocado em caixas teladas, estes foram acondicionados e alimentados da mesma forma da colônia de manutenção. Os indivíduos do grupo controle foram manipulados da mesma forma dos tratamentos, apenas diferindo pela ausência de conídios.

Os tratamentos foram observados diariamente para a remoção dos adultos mortos. Estes foram sexados e colocados em câmara úmida para visualizar a germinação, ou não, de *Metarhizium anisopliae*. Todos os tratamentos foram acompanhados durante 10 dias.

#### **4.4 Transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica***

Para a avaliação da transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* as moscas foram sexadas e separadas logo após a emergência, os adultos ficaram separados por quatro dias. Na gaiola contendo apenas fêmeas foi colocado um substrato de oviposição para estimular a maturação do sistema reprodutor.

Foram realizados dois bioensaios para avaliar a transmissão horizontal, um consistindo na transmissão de machos contaminados para fêmeas saudáveis e outro em que a transmissão ocorreu e fêmeas contaminadas para machos saudáveis. Após os quatro dias as fêmeas ou machos foram mergulhados por um segundo em

suspensão fúngica na concentração de  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>, sendo o tratamento controle composto apenas por água destilada estéril adicionada de 0,01% de Tween 80. Durante todo o experimento os adultos dos bioensaios foram alimentados da mesma forma que os das colônias de manutenção. Foram utilizados 180 casais de *Musca domestica*, separados em nove gaiolas teladas, cada uma contendo 20 casais, sendo três gaiolas do grupo controle e seis do tratamento com a suspensão fúngica.

As gaiolas foram revisadas diariamente e os adultos encontrados mortos foram acondicionados em placas de Petri com papel filtro umedecido e levados à estufa climatizada (25°C, UR 70% ± 10% e fotofase de 12h) para observar o crescimento ou não de *M. anisopliae*. Os tratamentos contendo os adultos foram observados ao longo de 15 dias.

#### **4.5 Influência do período de infecção na transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica***

Os adultos de *Musca domestica* foram sexados logo após a emergência, armazenados em gaiolas teladas mantidas em estufa climatizada (25°C, fotoperíodo de 12h e UR 70% ± 10%) e alimentados da mesma forma que a colônia de manutenção.

Foram realizados dois bioensaios para a avaliação da transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em função do tempo decorrido de infecção de adultos de *M. domestica*. Em cada bioensaio foram utilizados 275 adultos de *M. domestica* com quatro dias, sendo que destes foram mergulhados 25 adultos, durante um segundo, em 1mL de suspensão de *M. anisopliae* na concentração de  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup>.

Para avaliar a contaminação de fêmeas de *M. domestica* em função do tempo decorrido da infecção dos machos por *M. anisopliae*, 250 fêmeas foram expostas a 25 machos contaminados. A exposição ocorreu em cinco tratamentos com intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96h, cada tratamento representando um período de tempo decorrido da contaminação, contendo cinco réplicas cada. As réplicas foram constituídas de 10 fêmeas virgens (não contaminadas) e um macho contaminado por gaiola.

Para a contaminação dos machos em função do tempo decorrido da infecção das fêmeas foi utilizada a mesma metodologia da avaliação da contaminação das fêmeas em função do tempo decorrido da infecção dos machos, porém cada réplica foi constituída de 10 machos sadios e uma fêmea contaminada.

Nos tratamentos os espécimes não contaminados permaneceram em contato com os infectados por um período de 24h, em seguida foram isolados em placas de Petri com papel filtro úmido e levados a estufa climatizada (25°C, UR>70% e fotoperíodo de 12h) para verificar o crescimento de *M. anisopliae*.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Ação de diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Musca domestica*

As suspensões nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> de *Metarhizium anisopliae* apresentaram redução significativa na sobrevivência de adultos de *Musca domestica* (Chi= 332,11; G.L.= 4; p<0,0001) com mortalidade de 25,56%; 84,45% e 97,78%, respectivamente, de adultos tratados (Tab. 1). Todavia a suspensão na concentração de  $10^4$  conídio.ml<sup>-1</sup> não apresentou diferença significativa do grupo controle (Chi=1169,005; p=0,764) (Fig. 1).

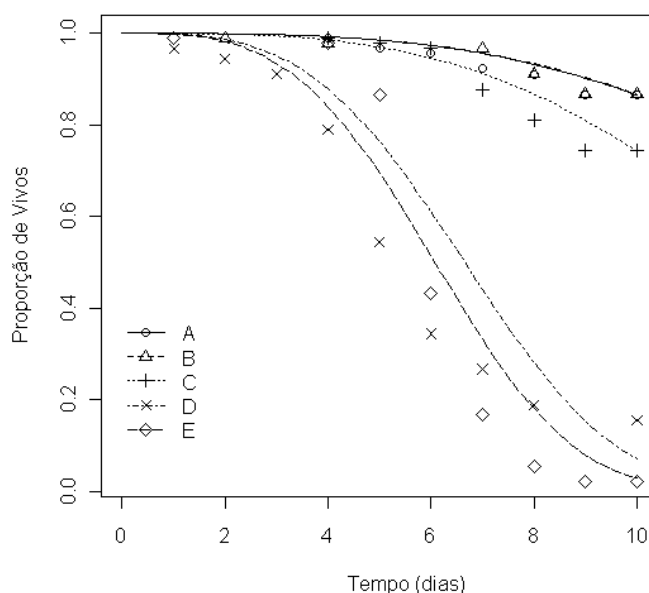


Figura 1- Curva de sobrevivência de adultos de *Musca domestica* em função do tempo (dias) frente a diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* em condições de laboratório (25°C, UR> 70% e fotofase de 12h). A= tratamento controle; B, C, D e E= tratamento com suspensão fúngica nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 1- Mortalidade acumulada para adultos de *Musca domestica*, durante 10 dias, em função da ação das diferentes concentrações de suspensão de *Metarhizium anisopliae*

Concentração (conídios.ml <sup>-1</sup> )	Fêmeas infectadas (%)
10 <sup>5</sup> conídios.ml <sup>-1</sup>	25,56%
10 <sup>6</sup> conídios.ml <sup>-1</sup>	84,45%
10 <sup>7</sup> conídios.ml <sup>-1</sup>	97,78%

O efeito de *M. anisopliae* sobre *M. domestica* e a relação de aumento de concentração com aumento de mortalidade, têm sido também demonstrados em diferentes fases do desenvolvimento da mosca. Estudos demonstram elevada virulência de *M. anisopliae* para o terceiro instar larval de *M. domestica*, onde o tratamento preveniu 100% da emergência de moscas (BARSON; RENN; BYWATE, 1994). Segundo Bernardi et al. (2006) larvas de *M. domestica* expostas a *M. anisopliae* reduzem a viabilidade dos estágios de pupas.

Todas as concentrações de *M. anisopliae* se apresentaram viáveis para a obtenção da redução da sobrevivência de *M. domestica*. A concentração de 10<sup>6</sup> conídios.ml<sup>-1</sup> de *M. anisopliae* foi mais efetiva para alcançar uma redução da sobrevivência de *M. domestica*, se comparada a maior concentração usada, pois se trata de uma concentração mais fácil de ser obtida.

## 5.2 Transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica*

No bioensaio de transmissão horizontal foi possível observar que houve transmissão do fungo entre os adultos de *Musca domestica*, já que 100% das fêmeas e machos sadios expostos, respectivamente, a machos e fêmeas previamente infectados apresentaram, depois de mortas, germinação de *Metarhizium anisopliae*.

O tratamento no qual os machos e fêmeas foram previamente mergulhados na suspensão fúngica de *M. anisopliae* foi efetivo na redução da sobrevivência de fêmeas (ff) e machos (mf), respectivamente, quando comparados aos tratamentos controle (f, m) (GL=3; X<sup>2</sup>= 177,16; p<0,001), conforme os modelos  $Y_f = e^{23,59418 - 3,039514 \times tempo^{3,039514}}$ ;  $Y_m = e^{20,90505 - 3,039514 \times tempo^{3,039514}}$ ;  $Y_{ff} = e^{7,30822 - 3,039514 \times tempo^{3,039514}}$  e  $Y_{mf} = e^{15,56461 - 3,039514 \times tempo^{3,039514}}$  (Fig. 2).

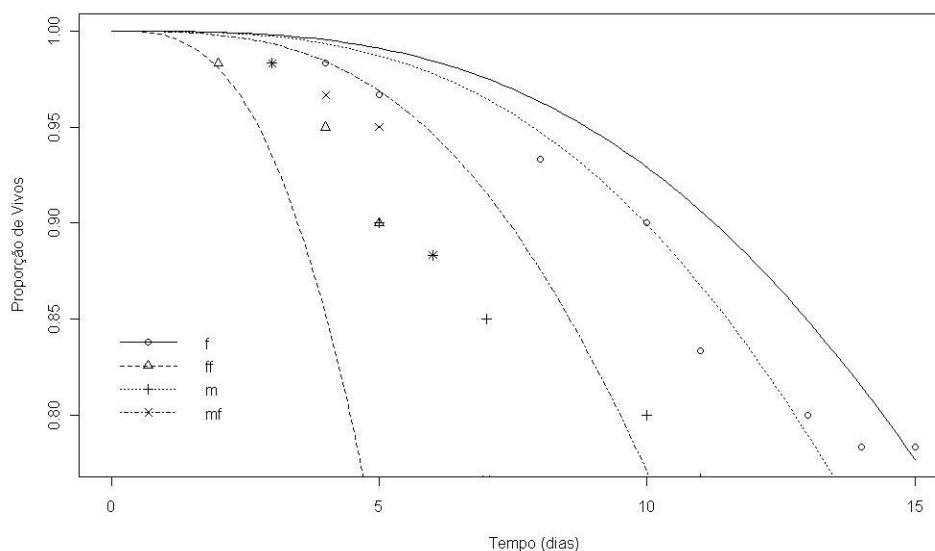


Figura 2- Curva de sobrevivência de adultos de *Musca domestica* em função do tempo (dias) para machos e fêmeas expostos a suspensão de *Metarhizium anisopliae* na concentração de  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>, em condições de laboratório (25°C, UR> 70% e fotofase de 12h). Sendo f= fêmeas e m= machos do tratamentos controle; ff= fêmeas sadias expostas a machos infectados e fm= machos sadios expostos a fêmeas infectadas dos tratamentos com suspensão fúngica.

Nos grupos controle o fator sexo não influencia na sobrevivência de adultos de *M.domestica* ( $p= 0,321$ ). Diferente do que ocorre nos grupos tratados, pois quando os machos contaminam as fêmeas sadias a sobrevivência é reduzida com maior amplitude se comparado a quando as fêmeas contaminam os machos sadios. Dado também encontrado por Quesada-Moraga et al. (2008), em adultos de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), onde usaram suspensão de *M. anisopliae* na concentração de  $1.0.10^8$  conídio/ml, em que a mortalidade de fêmeas expostas a machos contaminados foi mais elevada que quando os machos saudáveis foram expostos a fêmeas contaminadas.

Segundo Quesada-Moraga et al. (2008) a posição do corpo de ambos os sexos, no momento do acasalamento, também influencia a transmissão de patógenos.

Apesar do resultado obtido, sobre a transmissão horizontal de *M. anisopliae* sobre *M. domestica*, com 100 % de mortalidade de fêmeas expostas a machos contaminados, se faz necessário um estudo para a verificação da influência do *M. anisopliae* sobre o comportamento de acasalamento de *M. domestica*, e observar se existe relação na competitividade sexual de machos e fêmeas tratados com fungo e sadios. Em investigação do efeito de inoculação de *M. anisopliae* sobre comportamento de acasalamento de três espécies de moscas-da-fruta, *Ceratitis*



*capitata* (Wiedemann), *Ceratitis cosyra* (Bezzi) e *Ceratitis fasciventris* (Walker), Dimbi, Maniania e Ekesi (2009) demonstram que de zero a dois dias pós-inoculação machos contaminados competiram com igualdade com machos sadios, porém, no terceiro dia se obteve uma maior taxa de acasalamentos de fêmeas com machos sadios do que com os contaminados pelo fungo.

Uma estratégia que poderia ser adotada para o controle de adultos de *M. domestica* no ambiente é a técnica do macho estéril, em que se usariam machos estéreis contaminados por *M. anisopliae* para serem liberados no ambiente. Gullan e Cranston (2007) os machos estéreis liberados no ambiente se misturam com a população selvagem, diminuindo a proporção de acasalamentos férteis. Novelo-Rincón et al. (2009) observaram que em *Anastrepha ludens* (Loew) não há diferença na atividade de cópula ao se comparar machos estéreis não contaminados e machos estéreis com a presença de conídios de *Beauveria bassiana*, já em machos selvagens tratados e não tratados com o fungo, houve diferença na atividade de cópula, nos machos tratados ocorreu redução no desempenho de cópula.

### **5.3 Influência do período de infecção na transmissão horizontal de *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica***

O período de infecção dos adultos de *Musca domestica* influenciou a germinação de *Metarhizium anisopliae* (Chi=65,556;  $p < 0,001$ ). Quanto maior o tempo decorrido do período de infecção do macho ou fêmea, menor é a probabilidade de contaminação de fêmeas e machos, respectivamente (Fig. 3).

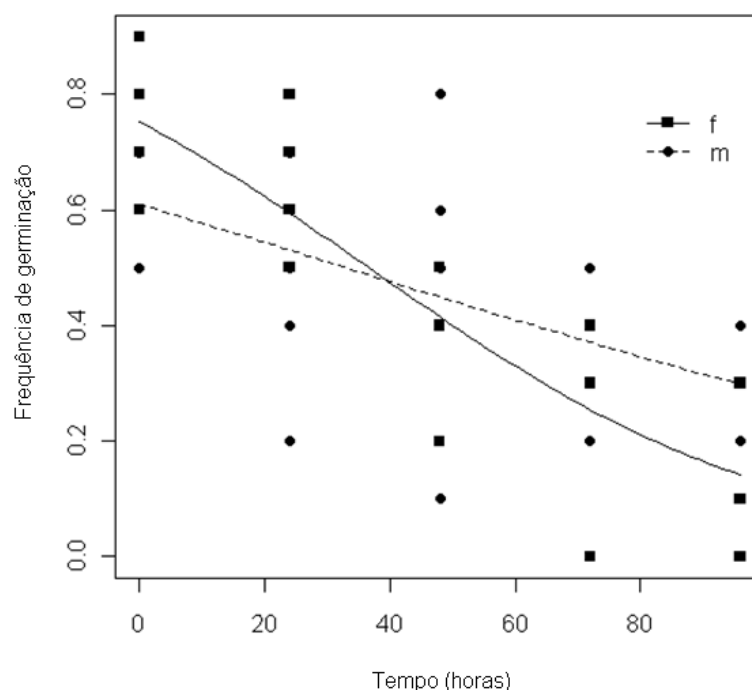


Figura 3 – Frequência de germinação do fungo *Metarhizium anisopliae* em adultos de *Musca domestica* em função do tempo (horas) de contaminação de fêmeas (f) e machos (m), em condições de laboratório (25 °C, UR > 70% e fotofase de 12h).

A contaminação de fêmeas sadias de *M. domestica* por machos previamente infectados por *M. anisopliae* tende a diminuir conforme se aumenta o tempo decorrido da infecção dos machos, variando de 74% a zero hora até 14% a 96h após a contaminação. Assim como a contaminação de machos sadios por fêmeas previamente infectadas também tende a diminuir conforme se aumenta o tempo decorrido da infecção das fêmeas, variando de 66% a zero hora até 32% a 96h após a contaminação (Tab. 2).

A transmissão horizontal poderia ser facilitada com o uso de conídios secos, já que, na suspensão o espalhante adesivo fixa os conídios ao corpo do inseto, o que pode dificultar a infecção de outros insetos. Esse melhor desempenho por conídios secos já foi observado por Quesada-Moraga et al. (2008) que, testando conídios secos e em suspensão sobre a transmissão horizontal de *M. anisopliae* em adultos de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), tiveram melhores resultados ao usar os conídios secos, com 90% e 85% de crescimento fúngico, respectivamente, de fêmeas sadias expostas a machos infectados e machos sadios expostos a fêmeas contaminadas, com o uso de conídios em suspensão, obtiveram

70% e 55% de crescimento fúngico, respectivamente, de fêmeas sadias expostas a machos infectados e machos sadios expostos a fêmeas contaminadas.

Tabela 2- Influência do tempo de infecção de machos e fêmeas de *Musca domestica* sobre a transmissão genérica cruzada, de *Metarhizium anisopliae*

Tempo de infecção (h)	Fêmeas infectadas (%)	Machos infectados (%)
0 hora	74%	66%
24 horas	64%	44%
48 horas	36%	50%
72 horas	28%	34%
96 horas	14%	32%

A germinação dos conídios de *M. anisopliae* ocorre logo após o contato o conídio com a cutícula do hospedeiro (FRANCESCHINI, et al., 2001). Abreu et al. (1983) afirmam que a forma mais adequada para uso de fungos no controle biológico, é o conídio seco, sendo mais resistente as condições ambientes, podendo ser preservado por até um ano. Conforme Walstad, Anderson e Stambaugh (1970) a germinação de esporos em um período de 24 horas, com UR de 100%, é de até 57%, já com umidade abaixo de 92,5% ocorre inibição da germinação dos esporos.

## 6 Conclusões

O fungo *Metarhizium anisopliae* é patogênico para adultos de *Musca domestica*, e a sobrevivência desse díptero diminui conforme o aumento da concentração de conídios usada.

A transmissão horizontal de *M. anisopliae* ocorre em adultos de *M. domestica* reduzindo a sobrevivência desses muscídeos.

O período de infecção dos adultos *M. domestica* influenciou a germinação de *M. anisopliae*.

## Referências

- ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em função do período e condições de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.50, n.1, p.57-63, 1983.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO, A.; ALVES, L.F.A. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. 1163p.
- BARSON, G.; RENN, N.; BYWATE, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, n.2, p.107-113, 1994.
- BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; NASCIMENTO, J. S.; RIBEIRO, P.B.; SILVA, C.I. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.127-129, 2006.
- CAFARCHIA, C.; LIA, R. P.; ROMITO, D.; OTRANTO, D. Competence of the housefly, *Musca domestica*, as a vector of *Microsporium canis* under experimental conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, v.23, n.1, p.21-25, 2009.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; EKESI, S. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. **Biological Control**. v.50, p.111–116, 2009.
- FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.22, p.18-21, 2001.
- FRANCESCHINI, M., et al. O entomopatogeno *Metarhizium anisopliae*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.23, p.32-37, 2001.
- GRACZYK, T. K.; KNIGHT, R.; TAMANG, L. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.1, p.128-132, 2005.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os Insetos**: um resumo de entomologia. São Paulo: Roca, 2007. 440p.

KRASNOFFA, S. B.; WATSONB, D. W.; GIBSONA, D. M.; KWANA, E. C. Behavioral effects of the entomopathogenic fungus, *Entomophthora muscae* on its host *Musca domestica*: Postural changes in dying hosts and gated pattern of mortality. **Journal of Insect Physiology**, v.41, n.10, p.895-903, 1995.

LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, v.34, n.6, 2004.

MAGALHÃES, B.; FARIA, M.; FRAZÃO H. A technique to estimate the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) formulated in vegetable oil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.3, 1997.

MARICONI, F. A. M.; GUIMARÃES, J. H.; BERTI FILHO, E. **A mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 135p.

MELO, D.R. DE; CRUZ, G.B. DA; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.16, n.3, p.166-170, 2007.

MURVOSH, C.M.; FYE, R.L.; LABRECQUE, G.C. Studies on the mating behavior of the house fly, *Musca domestica* L. **The Ohio Journal of Science**. v.64, p.264, 1964.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. 494p.

NOVELO-RINCÓN, L.F.; MONTOYA, P.; HERNÁNDEZ-ORTÍZ,V.; LIEDO, P.; TOLEDO, J. Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Dipt., Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Journal of Applied Entomology**. v.133, p.702-710, 2009.

OLIVEIRA, V. C.; D'ALMEID, A. J. M.; ABALEM DE SÁ, I. V.; MANDARINO, J. R.; SOLARI, C. A. Enterobactérias associadas a adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) no Jardim Zoológico, Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.556-561, 2006.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.;BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 635p.

PRADO, Â.P. Controle das principais espécies de moscas em áreas urbanas. **Biológico**, v.65, n.1/2, p.95-97, 2003.

QUESADA-MORAGA E. ; MARTIN-CARBALLO, I.; GARRIDO-JURADO, I.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**. v.47, p.115-124, 2008.

- QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIRÓS, R.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.87, p.51–58, 2004.
- RENN, N.; BYWATER A.F.; BARSON, G. A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. **Journal of Applied Entomology**, v.123, p.309-314, 1999.
- RIBEIRO, P. B.; CARVALHO, C. J. B.; CHERNAKI, A.M.; COSTA, P.R.P. Longevidade, oviposição e viabilidade pupal de *Ophyra aenescens* Wiedemann, 1830 (Diptera, Muscidae, Azeliinae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n. 6, p.264-268, 2000.
- ROBINSON, W.H. **Urban entomology**. Londres:Chapman & Hall, 1996. 430p.
- ROY, H.E.; STEINKRAUS, D.C.; EILENBERG, J.; HAJEK, A.E.; PELL, J.K. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.331–357, 2006.
- SCHOLTE, E.J.; KNOLS, B.G.J.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Malaria Journal**, v.3, n.45, p.1-6, 2004.
- TAN, S. W.; YAP, K. L.; LEE, H. L. Mechanical Transport of Rotavirus by the Legs and Wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v.34, n.5, p.527-531, 1997.
- TRAVERSA, D.; OTRANTO, D.; IORIO, R.; CARLUCCIO, A.; CONTRI, A.; PAOLETTI, B.; BARTOLINI, R.; GIANGASPERO, A. Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, v.22, n.3, p.283–287, 2008.
- WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscadine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, p.221-226, 1970.