

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGECB

ESTUDOS DAS INTERAÇÕES DE *Helicoverpa armigera*
(HÜBNER, 1805) AO PREDADOR *Chrysoperla externa* (HAGEN,
1861) E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Pamella Mingotti Dias

Dourados-MS
Dezembro de 2019

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Pamella Mingotti Dias

ESTUDOS DAS INTERAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER, 1805)
AO PREDADOR *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) E FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Dra. Elisângela de Souza Loureiro

Dourados-MS
Dezembro de 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D541e Dias, Pamela Mingotti
ESTUDOS DAS INTERAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER, 1805) AO PREDADOR
Chrysoperla externa (HAGEN, 1861) E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS [recurso eletrônico] /
Pamella Mingotti Dias. -- 2020.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Elisângela de Souza Loureiro.
Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal da
Grande Dourados, 2019.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. lagarta do velho mundo. 2. lepidóptero-praga. 3. crisopídeo. 4. Hypocreales. 5. controle
biológico. I. Loureiro, Elisângela De Souza. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"ESTUDOS DAS INTERAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER, 1805) AO
PREDADOR *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS"

Por

PAMELLA MINGOTTI DIAS

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação


Dr.ª Elizângela de Souza Loureiro
Orientadora/Presidente – UFMS


Dr. Wedson Desidério Fernandes
Membro Titular – UFGD


Dr.ª Ivana Fernandes da Silva
Membro Titular – UFGD


Dr. Luis Gustavo Amorim Pessoa
Membro Titular – UFMS


Dr. Samir Oliveira Kassab
Membro Titular – Legado Pesquisa e Consultoria

Aprovada em: 10 de dezembro de 2019

BIOGRAFIA

Eu, **Pamella Mingotti Dias**, filha de Zilda Monteiro Mingotti e Antônio Marcos Dias, Sul-Mato-Grossense nascida no dia 27 de julho de 1990, no município de Batayporã. Cursei na pré-escola na Escola Municipal Benedita Figueiró de Oliveira (1995-1996), o ensino fundamental (1997-2004) e ensino médio (2005-2007), na Escola Estadual Jan Antonin Bata, em Batayporã, MS. No ano de 2008 ingressei na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), no curso de Agronomia (Bacharelado), no município de Cassilândia, MS (UUC). No período da graduação fui bolsista de iniciação científica/PIBIC, obtendo o primeiro contato com a metodologia científica na área de entomologia agrícola, com estudos de controle biológico com predadores e as interações com plantas *Bt*, sob a orientação da Profa. Dra. Luciana Cláudia Toscano Maruyama, e obtive o título de Engenheira agrônoma em 2012. Em março 2013 iniciei o Mestrado em Agronomia, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGAC), área de concentração em Sustentabilidade na Agricultura, (UEMS), (UUC), dando continuidade aos estudos de controle biológico com crisopídeos e interações, sob a orientação da Dra. Luciana, com a defesa concluída em fevereiro de 2015. Neste mesmo ano fui aprovada como professora substituta dos cursos de Agronomia e Engenharia Florestal, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) campus de Chapadão do Sul (CPCS), onde permaneci até março de 2016. Em maio de 2016, em busca de aprofundar o conhecimento sobre os insetos e o manejo integrado de pragas, iniciei o Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB) pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, e executei a pesquisa científica na (UFMS, CPCS), atuando na linha de pesquisa de controle microbiano, predadores e interações entre entomófagos e microrganismos, sob a orientação da profa. Dra. Elisângela de Souza Loureiro, submetendo-se a defesa da Tese em dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Sou grata à Deus, por todas experiências vividas até o presente momento e por estar concluindo uma importante etapa de minha vida.

Agradeço a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), pela oportunidade do doutoramento.

Aos professores do (PPGECB-UFGD), pelo conhecimento prático e teórico repassado com tanto carinho e dedicação, através das disciplinas lecionadas.

Ao secretário Vitor Cunha, pela disponibilidade e suporte neste período.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pela concessão de bolsa de doutorado (59/300.513/2016), propiciando o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Chapadão do Sul, MS, (CPCS), pela disponibilidade das dependências do Laboratório de Entomologia.

À minha orientadora, professora Dra. Elisângela de Souza Loureiro, pelo acolhimento em Chapadão do Sul, pela amizade, disponibilidade, entusiasmo na orientação e condução dos bioensaios, ensinamentos práticos de patologia de insetos, revisão dos manuscritos e diversos outros atributos que contribuíram para o meu amadurecimento profissional.

Ao professor, Dr. Luis Gustavo Amorim Pessoa, pela disponibilidade dos equipamentos e utensílios do Laboratório de Entomologia, CPCS, além dos ensinamentos práticos e teóricos para condução dos bioensaios.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Wedson Desidério Fernandes, Dr. Luis Gustavo Amorim Pessoa, Dr. Samir Oliveira Kassab e Dra. Ivana Fernandes Silva, pela disponibilidade, correções e sugestões para melhoria desta pesquisa.

Aos membros do grupo de pesquisa LAMIP e os estagiários da (UEMS), pelo auxílio na condução dos bioensaios.

Ao professor, Dr. Paulo Eduardo Teodoro, pelo auxílio na análise dos dados estatísticos.

A minha família Mingotti, em especial minha mãe, irmãos e avós maternos, pelo carinho, dedicação, suporte psicológico e financeiro durante o período de doutoramento.

Aos meus amigos de Batayporã, Cassilândia, Dourados e Chapadão do Sul, MS, pelas conversas confortantes, conselhos e prestação de auxílio, sempre que possível.

A família Ribeiro Reghin, que também faço como minha, pelo acolhimento e carinho.

As minhas amigas da república “Casa amarela” e ao meu grupo “As Márcias” que dividiram comigo a casa, os custos, os projetos de vida, conquistas e dificuldades durante a estadia em Chapadão do Sul, MS.

As famílias Amaral e Prado Sousa que me acolheram como parte de suas famílias.

Aos colegas de turma do (PPGECB-UFGD) do ano de 2016, nos quais possuo grande estima e amizade.

Agradeço todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para meu crescimento profissional, execução deste grande projeto culminado as publicações.

“Comece fazendo o necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível. ”

(São Francisco de Assis)

Dedico

À minha mãe e aos meus irmãos,
Zilda, Stéffano, Lucas e Ana Clara,
por serem minha força e porto seguro.

Aos meus avós maternos,
Benedito Mingotti e Aparecida Monteiro Mingotti,
por serem meus exemplos de amor e companheirismo.

À minha saudosa tia,
Helena Monteiro Mingotti da Costa (*In memoriam*),
por ser uma mulher forte, determinada e
educadora exemplar.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO GERAL	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Aspectos gerais de <i>Helicoverpa armigera</i>	6
2.2 Aspectos biológicos de <i>H. armigera</i>	7
2.3 Importância econômica de <i>H. armigera</i>	8
2.4 Manejo Integrado de <i>H. armigera</i>	8
2.5 Aspectos gerais de <i>Chrysoperla externa</i>	10
2.6 Importância do <i>C. externa</i> no manejo de pragas.	11
2.7 Fungos entomopatogênicos.....	12
2.8 Aplicabilidade dos fungos entomopatogênicos no controle de pragas	12
2.9 Interações entre fungos entomopatogênicos e insetos entomófagos.....	14
3 OBJETIVO GERAL	17
4 HIPÓTESES	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	19
Capítulo I	31
Fungos entomopatogênicos no manejo de <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	31
1. Introdução	32
2. Material e Métodos	33
2.1 <i>Obtenção dos fungos entomopatogênicos</i>	33
2.2 <i>Obtenção e criação massal de <i>Helicoverpa armigera</i></i>	33
2.3 <i>Bioensaios</i>	33
2.4 <i>Análise estatística</i>	34
3. Resultados	34
3.1. <i>Mortalidade de primeiro instar de <i>Helicoverpa armigera</i></i>	34
3.2. <i>Mortalidade de segundo instar de <i>Helicoverpa armigera</i></i>	35
3.3. <i>Mortalidade de terceiro instar de <i>Helicoverpa armigera</i></i>	36
3.4. <i>Mortalidade de quarto instar de <i>Helicoverpa armigera</i></i>	37
3.5. <i>Mortalidade de quinto de <i>Helicoverpa armigera</i></i>	38

4. Discussão -----	39
5. Conclusões -----	40
Referências -----	41
Capítulo II -----	44
Virulence of Entomopathogenic Fungi on Larvae of <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae) -----	44
1. Introduction -----	45
2. Materials and Methods -----	46
1.1. <i>Obtaining and rearing Chrysoperla externa</i> -----	46
2.3 <i>Selectivity of the entomopathogenic fungi to Chrysoperla externa larvae</i> -----	46
2.4 <i>Statistical Analysis</i> -----	47
3. Results -----	47
3.1. <i>Mortality and duration of the first instar of Chrysoperla externa</i> -----	47
3.2. <i>Mortality and duration of the second instar of Chrysoperla externa</i> -----	50
3.3. <i>Mortality and duration of the third instar of Chrysoperla externa</i> -----	52
3.4. <i>Confirmed mortality</i> -----	53
4. Discussion -----	56
5. Conclusions -----	57
References -----	58
Capítulo III -----	61
Interactions between Fungal-Infected <i>Helicoverpa armigera</i> and the Predator <i>Chrysoperla externa</i> -----	61
1. Introduction -----	63
2. Materials and Methods -----	64
2.1. <i>Collection and Rearing of H. armigera</i> -----	64
2.2. <i>Collection and Rearing of C. externa</i> -----	64
2.3. <i>Fungal Isolates</i> -----	64
2.4. <i>Interaction between C. externa and Fungi-Treated H. armigera</i> -----	64
2.5. <i>Statistical Analysis</i> -----	65
3. Results -----	65
3.1. <i>Interaction between C. externa and Fungi-Treated H. armigera Eggs</i> -----	65
3.2. <i>Interaction between C. externa and Fungi-Treated H. armigera Larvae</i> -----	66

3.3. Effect of Entomopathogenic Fungi on Predator Behavior ----- **67**

4. Discussion----- **68**

5. Conclusions ----- **69**

References ----- **70**

ANEXOS----- **74**

RESUMO GERAL

O manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil, baseia-se principalmente no uso de inseticidas químicos, biológicos e plantas *Bt*. No entanto, existem lacunas sobre as possíveis interações entre o uso destas práticas e os agentes de controle natural, como os crisopídeos e os fungos entomopatogênicos. Este estudo teve por objetivo avaliar as interações entre o predador *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) e os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (isolado ESALQ PL63), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (isolado ESALQ E9) e *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson (isolado UFMS 03), para o controle de *H. armigera*. O experimento foi subdividido em 3 bioensaios, todos conduzidos em condição de laboratório, sob T°C 25±1°C, UR de 70±10% e fotoperíodo de 12 horas (luz e escuro =L: D), com os seguintes tratamentos (P): controle (água destilada esterilizada + 0.001% Tween80[®]) (T1); *B. bassiana* (T2); *M. anisopliae* (T3) e *M. rileyi* (T4), aplicados através de torre de Potter adaptada, nas concentrações (C): (1×10⁷; 1×10⁸ e 1×10⁹ conídios mL⁻¹), utilizando duas metodologias de aplicação (A): aplicação direta (DA) e filme seco (DF). Para o 1^o bioensaio foi avaliada a virulência de *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03) sobre lagartas de 1^o, 2^o, 3^o, 4^o e 5^o instar de *H. armigera*. O 2^o bioensaio verificou a seletividade destes fungos sobre larvas de 1^o, 2^o, 3^o de *C. externa*. O 3^o bioensaio avaliou a interação destes microrganismos com *C. externa* através da aplicação dos tratamentos sobre ovos (< 24 horas) e lagartas (1-3 mm) de *H. armigera* e oferecidos para larvas de 3^o instar do predador em diferentes tempos (0, 24 e 48 HAA). Os três bioensaios utilizaram (DIC) como delineamento experimental, com arranjo fatorial (4 × 3 × 2), composto por 4 tratamentos (P), 3 concentrações (C) e 2 metodologias de aplicação (A). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando o software Rbio. Os resultados do 1^o bioensaio indicam baixa virulência dos isolados testados sobre *H. armigera*, independente das concentrações ou métodos de aplicação. O 2^o bioensaio demonstrou que *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03) apresentam seletividade às larvas de 1^o, 2^o, 3^o instar de *C. externa*; e *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63) proporcionou baixa mortalidade sobre os três estágios larvais do predador (120 HAA). Os resultados do 3^o bioensaio demonstram que os isolados nas concentrações e metodologias de exposição testadas, não interferem no desenvolvimento biológico e potencial predatório de *C. externa* sobre os ovos e lagartas de *H. armigera*, nos diferentes tempos de exposição. Existe a possibilidade de utilização conjunta de *C. externa* e dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03), devido a seletividade destes isolados aos três instares larvais do crisopídeo e a interação positiva entre os fungos entomopatogênicos e as larvas de *C. externa* no controle de ovos e lagartas pequenas de *H. armigera*.

Palavras-chave: lagarta do velho mundo; lepidóptero-praga; Neuroptera; crisopídeo; Ascomycota; Hipocreales; controle biológico; controle microbiano.

ABSTRACT

The management of *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil is mainly based on the use of chemical, biological insecticides and *Bt* plants, however, there are gaps about the possible interactions between the use of these practices and the agents of natural control, such as lacewings and entomopathogenic fungi. The aim of this study was to evaluate the interactions between the predator *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) and the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (isolado ESALQ PL63), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) and *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson (isolado UFMS 03), for the control of *H. armigera*. The experiment was subdivided into 3 bioassays, all conducted under laboratory conditions, under T°C 25 ± 1°C, 70 ± 10% RH and 12 hours photoperiod (light and dark = L: D), with the following treatments. (P): control (sterile distilled water + 0.001% Tween80®) (T1); *B. bassiana* (T2); *M. anisopliae* (T3) and *M. rileyi* (T4), applied through an adapted Potter tower at concentrations (C): (1 × 10⁷; 1 × 10⁸ and 1 × 10⁹ conidia mL⁻¹) using two methodologies of Application (A): Direct application (DA) and dry film (DF). For the 1st bioassay the virulence of *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) and *M. rileyi* (isolado UFMS 03) on 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th instar caterpillars of *H. armigera*. The 2nd bioassay verified the selectivity of these fungi on larvae of 1st, 2nd, 3rd of *C. externa*. The 3rd bioassay evaluated the interaction of these microorganisms with *C. externa* by applying treatments on eggs (<24 hours) and *H. armigera* caterpillars (1-3 mm) and offered to 3rd instar larvae of the predator at different times (0, 24 and 48 HAA). The three bioassays used (DIC) o experimental design, with factorial arrangement (4 × 3 × 2), consisting of 4 treatments (P), 3 concentrations (C) and 2 application methodologies (A). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and comparison of means by Tukey test at 5% probability, using the Rbio software. The results of the 1st bioassay indicate low virulence of isolados tested on *H. armigera*, regardless of concentrations or application methods. The 2nd bioassay showed that *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) and *M. rileyi* (isolado UFMS 03) presented selectivity to the 1st, 2nd, 3rd instar larvae of *C. externa*; and *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63) provided low mortality over the predator's three larval stages (120 HAA). The results of the 3rd bioassay demonstrate that isolados at the concentrations and exposure methodologies tested do not interfere with the biological development and predatory potential of *C. externa* on *H. armigera* eggs and larvae at different exposure times. It is possible to use *C. externa* and entomopathogenic fungi *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) and *M. rileyi* (isolado UFMS 03) due to the selectivity of these isolados to the three larval instars. of green lacewing and the positive interaction between entomopathogenic fungi and *C. externa* larvae in the control of eggs and small larvae of *H. armigera*.

Keywords: old world bollworm; lepidopteran-pest; Neuroptera; lacewings; Ascomycota; Hypocreales; biological control; microbial control.

1 INTRODUÇÃO GERAL¹

A ocorrência de lepidópteros-pragas em altas populações tem impactado o setor agrícola e florestal com grandes prejuízos econômicos. A *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), considerada anteriormente no Brasil, uma praga Quarentenária A1 foi relatada pela primeira vez no ano de 2013 provocando prejuízos em culturas de importância econômica como soja, algodão e milho (CZEZAPK et al., 2013; ÁVILA et al., 2013; EMBRAPA, 2013).

As lagartas apresentam comportamento agressivo e hábito alimentar destrutivo, consumindo estruturas vegetativas e reprodutivas como flores, vagens e frutos (SARWAR et al., 2009; ÁVILA et al., 2013; PRATISSOLI et al., 2015). Os adultos desta espécie possuem capacidade de migração em longas distâncias e alto potencial reprodutivo (DRAKE, 1991; WANG; LI, 1884; SUZANA et al., 2015).

As estratégias de manejo de *H. armigera* no Brasil estão baseadas em estudos sobre o controle aplicado em outros países e, entre elas, verificamos o uso de armadilhas com feromônios sexuais, aplicação de inseticidas químicos e/ou formulações à base de microrganismos, respeitando a seletividade dos inimigos naturais, liberação de *Trichogramma* sp., uso de cultivares resistentes, *Bt* ou convencionais e destruição da soqueira (ÁVILA et al., 2013; CEZAPAK et al., 2013; FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013).

Embora estas práticas de manejo já tenham sido difundidas para o controle de lepidópteros-pragas ao longo dos anos, parte dos produtores as utilizam de forma incorreta, principalmente com o uso indiscriminado dos produtos químicos, biológicos e tecnologias *Bt* contribuindo para pressão de seleção de populações resistentes, constatada em relatos de resistência de *H. armigera* à aproximadamente 49 ingredientes ativos, em vários países (IRAC, 2016).

¹Esta Tese está de acordo com as “normas para redação de Tese/Dissertação” do Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.

O controle biológico é uma tática viável no controle de *H. armigera* (FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013). No entanto, o manejo integrado de pragas (MIP), não prioriza apenas o controle biológico de pragas, mas parte da premissa entre associação de várias ferramentas, tornando o conceito de MIP efetivo e harmônico (BUENO et al., 2017).

Os entomopatógenos e os insetos entomófagos são importantes componentes de programas de controle biológico (EMBRAPA, 2013; WANG et al., 2013). Predadores como *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861), apresentam importante papel na redução de populações de pragas, (SOUZA, 1999), com alto desempenho predatório sobre ovos de lepidópteros de diferentes espécies (BORTOLI et al., 2006; MURATA et al., 2006; PESSOA et al., 2010; ALBUQUERQUE; CRUZ, 2017). Além disso, características como sobrevivência no ambiente e facilidade de criação em laboratório justificam a sua utilização (AUAD et al., 2001; AUAD et al., 2005; BEZERRA et al., 2009; SILVA et al., 2004).

O controle microbiano também é uma prática de controle biológico muito eficaz, pois os fungos entomopatogênicos são responsáveis por aproximadamente 80% das doenças ocorridas em insetos por apresentarem vantagens em relação aos demais, como variabilidade genética, infecção em diferentes estágios do desenvolvimento do hospedeiro, penetração via tegumento e propágulos de alta capacidade de disseminação (SUJI et al., 2002; ALVES, 2008; MORA et al., 2017).

Existem aproximadamente 90 gêneros de fungos entomopatogênicos, que se destacam por provocar patogenicidade em artrópodes-pragas: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps*, *Isaria* e *Pandora* (SHANG et al., 2015). Estão entre os mais estudados *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metchinikoff, 1879) e *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson, por possuírem características favoráveis como a abundância no solo (LOMER et al., 2001) e provocar epizootias (IGNOFFO, 1981; ALVES; LOPES 2008). Epizootias do fungo *M. rileyi* são relatadas no Brasil, na regulação de populações de lagartas Noctuidae em culturas como: algodão, milho e soja, (COSTA et al.; 2015; LIMA et al.; 2015; DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2019).

Embora os agentes de controle biológico natural: entomófagos e entomopatógenos explorem o mesmo agroecossistema, não é possível descrever com exatidão sobre as interações que existem entre esses microrganismos benéficos e os artrópodes como predadores e parasitoides. Ao considerar a ação simultânea dos fungos entomopatogênicos e do *C. externa* é possível que o predador entre em contato direto com os conídios no momento da aplicação ao forragear a superfície foliar infectada, ou ainda, pelo consumo de presas que estejam com os conídios aderidos no exoesqueleto (ALVES, 1998; FRANÇA et al., 2006).

O sucesso do fungo entomopatogênico não depende apenas da alta patogenicidade em relação aos artrópodes-pragas, mas também na seletividade e baixa virulência sobre os insetos não-alvo (Portilla et al. 2017a).

Os estudos que permeiam a complexibilidade do terceiro nível trófico estão relacionados aos efeitos diretos e indiretos dos entomopatógenos através da ação endofítica dos microrganismos, com resultados de sinergismo entre os predadores e parasitoides (VEGA et al., 2018; CANASSA et al., 2019; GONZÁLEZ-MAS et al., 2019); ou através de aplicações diretas das suspensões fúngicas sobre os insetos, com implicações negativas correlacionadas com as altas dosagens (PORTILLA et al., 2017b).

Estudos que integram a ação de crisopídeos com entomopatógenos consideram benéfica a interações entre os fungos entomopatogênicos e o predador *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) (ZHU; KIM, 2012; RÍOS-MORENO et al. 2017) e *C. externa* (DIAS et al., 2019), possibilitando a ação conjunta destes inimigos naturais no manejo de pragas.

Diante dos trabalhos apresentados fica evidente a ação benéfica dos insetos entomófagos e dos entomopatógenos na regulação de populações de lepidópteros-pragas e, pressupõe-se que exista uma interação positiva entre os fungos entomopatogênicos e *C. externa* para o manejo de *H. armigera*. Deste modo, propõe-se avaliar as interações entre o predador *C. externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), os fungos

entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03), visando o manejo de *H. armigera*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais de *Helicoverpa armigera*

Alguns dos principais lepidópteros-pragas de importância agrícola pertencem a subfamília Heliiothinae e dentre esses destaca-se o gênero *Helicoverpa*, com diversas espécies de ocorrência nas Américas (HARDWICK, 1965). *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), apresenta problemas de identificação devido à similaridade morfológica com outras espécies do grupo *Heliothis* e que gera controvérsias desde a primeira identificação (CABI/EPPO, 1992).

Anteriormente, Hardwick descreveu *H. armigera* como *Heliothis armigera* Hübner ou *Heliothis obsoleta* F., no entanto, após a análise completa dos grupos de lagartas de ocorrência comum em espigas, Hardwick descreveu o gênero *Helicoverpa* composto por 18 espécies (MITTER et al., 1993).

As espécies que compõe à subfamília Heliiothinae, como a *H. armigera* é *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* e *Helicoverpa gelotopoeon* apresentam similaridades, pois compartilham algumas características morfológicas, como o padrão de coloração (ALI; CHOUDHURY, 2009). Devido as características similares com outras espécies de noctuídeos e a abrangência de plantas hospedeiras em diversos países, *H. armigera* apresenta várias sinonímias e nomes vulgares como: lagarta do velho mundo “old world bollworm” conhecido mundialmente (CABI, 2016).

Para facilitar a identificação em campo, a espécie apresenta características morfológicas importantes à serem analisadas como: o formato de "sela" no primeiro segmento abdominal a partir do quarto ínstar e o comportamento de dobrar a cápsula da cabeça em direção ao primeiro par de pernas falsas quando tocadas e tegumento coriáceo (MATTHEWS, 1993; ÀVILA et al., 2013). Para os adultos existe dimorfismo sexual,

sendo que as fêmeas possuem o primeiro par de asas de cor marrom-alaranjada enquanto os machos possuem o primeiro par de asas de cor cinza-esverdeada (CZEPAK et al. 2013).

2.2 Aspectos biológicos de *H. armigera*

Os lepidópteros apresentam metamorfose completa, composta pelas fases de ovo, larva, pré-pupa, pupa e adultos (ANEXO 1). O ovo de *H. armigera* apresenta forma oval, mais aguda na parte apical e pouco achatado na base com diâmetro de 0,5 mm. A postura possui coloração marfim e com o desenvolvimento embrionário adquire coloração mais escuro (CORTES, 1972) (ANEXO 1- A).

A espécie apresenta de cinco a seis instares larvais, variando de acordo com a disponibilidade e qualidade do alimento, condições climáticas e características genéticas (ARAÚJO, 1990) (ANEXO 1-B).

Uma característica marcante para identificar lagartas de *H. armigera* é a presença de tubérculos abdominais escuros e bem nítidos na região dorsal que se expressam a partir do quarto instar (MATTHEWS, 1999). A duração da fase larval varia de 15 a 17 dias; porém, em condições extremas pode variar, de 10,9 dias a 35°C e 41,1 dias a 15°C (FERREIRA, 1989; FIGUEIREDO et al., 2006).

Ao chegar ao final do último instar larval, variando entre o 5° ou 6° instar, a lagarta passa pela fase de pré-pupa, como características deste período o inseto cessa a alimentação, reduz sua movimentação, apresenta tamanho diminuto e procura abrigo para confeccionar um casulo, no qual a lagarta tece com fios de seda e cria uma proteção externa, para posterior transformação em pupa (ANEXO 1-C).

No início a pupa apresenta coloração verde-clara e após certo período o tegumento começa a ficar rígido e a pupa apresenta uma cor castanha (ANEXO 1-C e D), devido a ação do ambiente em conjunto com hormônios. Nesta fase já é possível através de observações genitália externas separa-las por sexo (ARAÚJO, 1990). A pupa apresenta um formato fusiforme e as dimensões variando de 12 a 20 mm com um estágio de duração de 10 a 14 dias (ALI; CHOUDHURY, 2009) (ANEXO 1-D).

Os adultos de *H. armigera* apresentam dimorfismo sexual, podendo-se distinguir a fêmea e o macho pela coloração e tamanho das asas. Os machos apresentam coloração das asas é verde acinzentada e envergadura com cerca de 35 mm (ANEXO 1- E); enquanto a fêmea apresenta uma coloração no tom base castanho rosado e envergadura de 40 mm aproximadamente (ANEXO 1-F). Nos dois sexos as asas anteriores apresentam uma mancha reniforme clara e uma linha com sete a oito pontos escuros na margem externa. As asas posteriores são de coloração branca, tendo uma larga banda distal preta apresentando uma mancha branca (ARAÚJO 1990). No entanto, para confirmação das espécies é imprescindível a caracterização morfológica, através da dissecção da genitália ou de ferramentas moleculares (POGUE 2004; TAY et al. 2013).

A fêmea efetua a postura de forma isolada ou em pequenos agrupamentos (ANEXO 1- H), normalmente na parte adaxial das folhas, ou sobre flores, talos e brotações terminais (MENSAH, 1996). De modo geral, as primeiras oviposições são inférteis e após 3 dias ficam cada vez mais amarelos, e cada fêmea ovoposita aproximadamente de 2.000 a 3.000 ovos, com período de incubação é de 3,3 dias (NASREEN; MUSTAFA 2000).

2.3 Importância econômica de *H. armigera*

A lagarta do velho mundo *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), considerada anteriormente no Brasil uma praga quarentenária, foi relatada pela primeira vez em regiões brasileiras no ano agrícola 2013/2014 proporcionando perdas em produtividade em importantes culturas como algodão, soja, milho feijão, tomate, sorgo, milheto, trigo, crotalaria e guandu (ÁVILA et al. 2013; CZEPAK et al., 2013; DEGRANDE; OMOTO, 2013).

Os danos estão relacionados ao comportamento agressivo e hábito alimentar destrutivo das lagartas, consumindo estruturas vegetativas e reprodutivas como flores, vagens e frutos (SARWAR et al. 2009; ÁVILA et al., 2013; PRATISSOLI et al. 2015). Os adultos desta espécie possuem capacidade de migração em longas distâncias e alto potencial reprodutivo (DRAKE, 1991; WANG; LI, 1884; SUZANA et al., 2015).

2.4 Manejo Integrado de *H. armigera*

O manejo de *H. armigera* tem se tornado ineficiente em alguns casos, devido características biológicas da espécie, como: hábito polífago, com mais de 100 espécies de plantas hospedeiras (FITT, 1989), dispersão e migração (DRAKE, 1991), dificuldade de identificação (TAY et al., 2013), seleção de populações resistentes à diversos grupos de inseticidas químicos (McCAFFERY, 1998; MARTIN et al., 2005; IRAC, 2016), evolução de resistência às proteínas inseticidas presentes em plantas *Bt* (ROMEIS et al. 2006; DOWNES et al. 2010) e principalmente pelo uso indiscriminado de inseticidas, por parte dos produtores, sem adoção de práticas de manejo integrado de forma correta e aplicável (EMBRAPA, 2013).

O manejo integrado bem estruturado é arquitetado pela ação conjunta de várias ferramentas, tornando o conceito de MIP efetivo e harmônico (BUENO et al., 2017). Como a *H. armigera* foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2013 (CZEPAK et al., 2013), o manejo adotado no Brasil seguiu modelos de manejo dos países nos quais a espécie-praga apresenta expressividade (TAY et al., 2013; FITT; WILSON, 2000). Entre as táticas de manejo destacam-se: uso de armadilhas com feromônios sexuais, aplicação de inseticidas químicos e/ou formulações à base de microrganismos, respeitando a seletividade dos inimigos naturais, liberação de *Trichogramma* sp., uso de cultivares resistentes, *Bt* ou convencionais e destruição da soqueira (ÁVILA et al., 2013; CEZAPAK et al., 2013; FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013).

Embora essas práticas sejam recomendadas para o manejo de lepidópteros-pragas, o controle químico através de inseticidas sintéticos incluindo organofosforados e piretróides tem sido priorizado para o controle de *H. armigera* em diversas culturas no mundo (FATHIPOUR; SEDARATIAN 2013). Este fato está correlacionado à ideia de menor custo de produção, falta de informações idôneas sobre o manejo integrado de pragas (MIP) e as possibilidades de aplicabilidade no campo (BUENO et al., 2017).

A premissa do manejo integrado de pragas (MIP) propõe a associação de ferramentas, com a possibilidade de associação e sinergismo entre os componentes de

controle, seja ele químico, biológico, mecânico, cultural, entre outros (LACEY et al., 2015; BUENO et al., 2017).

Dentre as estratégias de manejo a literatura contribui com relatos de práticas eficazes para regulação de populações de *H. armigera* e dentre essas destacam-se: época de plantio (ÀVILA et al., 2013), uso de variedades resistentes (BOIÇA JÚNIOR et al., 2015; FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013), uso de material geneticamente modificado, que expresse a proteína *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (BAKHSH et al., 2015) ou interfiram no RNA (RNAi e microRNA) (XIONG et al., 2013; AGRAWAL et al., 2015), monitoramento do inseto no campo (RAHMAN et al., 2016), tomada de decisão de acordo com nível de controle (SEDARATIAN et al., 2014), uso de inseticidas (CARNEIRO et al., 2014) e controle biológico (QAYYUM et al., 2015).

O controle biológico é uma tática viável no controle de *H. armigera* (FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013) e os entomopatógenos e insetos entomófagos são importantes componentes de programas de controle biológico (EMBRAPA, 2013; WANG et al., 2013).

2.5 Aspectos gerais de *Chrysoperla externa*

A fauna Neotropical de crisopídeos é muito rica em biodiversidade, com 82 gêneros (OSWALD, 2018) e destaque no Brasil para a espécie *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) (FREITAS, 2001; MAIA et al., 2004; BEZERRA et al., 2009).

Os crisopídeos apresentam metamorfose completa (ALBUQUERQUE et al., 2009). A fase larval possui três instares, nos quais somente neste período apresentam hábito predador (CANARD; PRINCIPI, 1984). Alimentam-se de insetos de tegumento mole como afídeos, ovos e lagartas pequenas (BORTOLI et al., 2006; DIAS et al., 2018; PESSOA et al., 2004).

Após a fecundação as fêmeas colocam os ovos no substrato presos a um fio delgado (pedicelo) (ANEXO 2- A) e essa característica é um fator evolutivo e raro, que compõe o mecanismo de defesa contra o hábito canibal da espécie ou de outros artrópodes (Smith,

1922). A fêmea pode colocar de 40 a mais de 2.000 ovos, com a viabilidade superior a 95%, dependendo da fonte alimentar (Waquil, 2003).

Ao eclodirem as larvas são de coloração marrom-acinzentada ou amarelo-palha, mudando para coloração amarelada ou marrom-clara, de acordo com o seu desenvolvimento. As larvas apresentam aparelho bucal sugador mandibular, onde as longas mandíbulas auxiliam na captura da presa, as pernas são do tipo ambulatórias normais e o corpo possui várias cerdas (SILVA, 1991) (ANEXO 2- B).

A fase larval apresenta três instares são predadoras (CANARD; PRINCIPI, 1984). O canibalismo entre as larvas recém-eclodidas e os ovos da mesma espécie é comum, seguindo até o final do período larval (Lira, 2005), mas se estiverem saciadas, elas não se tornarão canibais (CANARD; PRINCIPI 1984). A alimentação do predador é intensificada no 3º instar, onde as larvas consomem até 80% do alimento ingerido (CAETANO et al., 1996; ALBUQUERQUE, 2009). Ao final do 3º instar a larva passa por processo de pré-pupa (ANEXO 2- C), com interrupção da alimentação e posteriormente torna-se pupa, com o desenvolvimento do casulo de seda, produzida nos tubos de Malpighi e excretada pelo ânus (RIBEIRO, 1988) (ANEXO 2- D).

Os adultos possuem corpo delicado com aproximadamente 10-15 mm de comprimento, de coloração verde, e de asas transparentes, membranosas reticuladas, com asas anteriores com nervuras transversais costais, as antenas são filiformes, e olhos são de cor amarelo-ouro brilhantes (ANEXO 2- F), e alimentam-se de pólen e “honeydew” (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Os adultos mantidos em laboratório, alimentam-se de dieta artificial de lêvedo de cerveja e mel (RIBEIRO, 1988). O ciclo biológico tem duração de aproximadamente 40 dias, sendo que nas regiões tropicais, podem produzir, de 5 a 6 gerações por ano (WAQUIL, 2003).

2.6 Importância do *C. externa* no manejo de pragas.

É um inimigo natural de ocorrência comum em diversas regiões brasileiras (MAIA et al., 2004), com importância na regulação de populações de pragas como afídeos, mosca-

branca, ovos e pequenos lepidópteros além de ácaros (SANTOS et al., 2003; PESSOA et al., 2005; BEZERRA et al., 2009; ALBUQUERQUE, 2009).

Estudos comprovam a efetividade desta espécie predadora no controle biológico de pragas em cultivo de algodão, trigo, sorgo, citrus, pessegueiro, acerola e melão (PESSOA et al., 2005; LEBRE et al., 2007; PITWAK et al., 2016; PASINI, 2017; SILVA et al., 2017; HEWLETT et al., 2018; ARMAS et al., 2019).

Esta espécie têm despertado interesse nas pesquisas de controle biológico aplicado devido à facilidade de criação em laboratório e generalidade em presas consumidas (BEZERRA et al., 2009) e obtendo alto desempenho no consumo de ovos de lepidópteros de diferentes espécies (BORTOLI et al., 2006; MURATA et al., 2006; PESSOA et al., 2010), e ovos de *H. armigera* (ALBUQUERQUE; CRUZ, 2017).

2.7 Fungos entomopatogênicos

A palavra entomogênica foi derivada de duas palavras gregas: “*entomon*”, que significa insetos, e “*genes*”, significando surgir. De tal modo, o significado etimológico de microrganismo entomopatógeno é “microorganismos que surgem em insetos” (SANDHU et al. 2001).

Os fungos entomopatogênicos são de origem natural do solo, provocam epizootias em diversas espécies-pragas (IGNOFFO, 1981; ALVES; LOPES, 2008). Os microrganismos apresentam vantagens para o controle de pragas como: especificidade e seletividade, facilidade de multiplicação, dispersão, produção artificiais e ausência de poluição ambiental e toxicidade ao homem (ALVES, 1998).

O modo de ação dos fungos é através da infecção dos hospedeiros suscetíveis via penetração direta através da cutícula (ALVES; LOPES, 2008). No entanto, estudos têm demonstrado que diversas formas de inoculação destes microrganismos em plantas hospedeiras tem ação endofítica contra artrópodes-pragas (VEGA 2018).

2.8 Aplicabilidade dos fungos entomopatogênicos no controle de pragas

Os fungos entomopatogênicos são inimigos naturais de uma ampla variedade de artrópodes-pragas como ácaros e insetos (KHAN et al., 2012; LACEY et al. 2015). Com ocorrência de forma enzoótica sobre dípteros, himenópteros e ortópteros e epizoótica em coleópteros, lepidópteros, hemípteros (ALVES, 1998).

Epizootias de fungos entomopatogênicos são observadas frequentemente entre populações de insetos, caracterizando o grande potencial desses microorganismos para a redução de populações de pragas (KHAN et al., 2012). O primeiro relato da ação natural de fungo *M. rileyi* sobre *H. armigera* no Brasil foi em cultivo de algodão, no ano de 2015 (COSTA et al., 2015). Para o estado de Mato Grosso do Sul são relatadas epizootias e enzootias de *M. rileyi* sobre *H. armigera* em soja durante as safras de 2017/2018 e 2018/2019 (DIAS et al., 2018; DIAS et al., 2019).

Embora existam relatos da ação natural de *M. rileyi* sobre *H. armigera*, este fungo não possui formulação comercial, com estudos satisfatórios para produção do mesmo em arroz e diferentes níveis de hidratação (DIAS et al., 2017; LOUREIRO et al., 2019). A produção, armazenamento e formulação em massa *in vitro* dos fungos entomopatogênicos são fatores que tem restringido seu incremento como agentes de controle biológico (PELL et al., 2001).

Dentre os fungos mais utilizados no mundo para controle biológico aplicado destacam-se *B. bassiana* e *M. anisopliae*, devido à patogenicidade relatada sobre várias pragas-agrícolas de diferentes sistemas de cultivo do mundo (SANDHU et al. 2012). Em menor escala encontram-se os fungos *Lecanicillium muscarium*, *Lecanicillium longisporum* e *Lecanicillium fumosorosea* (VEGA, 2018).

A grande parte dos produtos comerciais, recomendados para o manejo de insetos e ácaros baseiam-se principalmente em *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* e *Lecanicillium* spp. (FARIA; WRAIGHT, 2007).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), no mercado de produtos fitossanitários existem aproximadamente 27 produtos à base *B. bassiana* e 38 produtos formulados com *M. anisopliae* e estes são recomendados para artrópodes-pragas de diversas culturas (MAPA, 2019).

Em relação o potencial patogênico dos fungos entomopatogênicos sobre *H. armigera*, a literatura contribui com estudos em condições de laboratório e campo

utilizando como agente de controle, isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson, nos quais demonstraram que essas espécies fúngicas apresentam alta virulência sobre diferentes instares larvais de *H. armigera* (HOLDOM; VAN DE KLASHORST, 1986; HASSANI 2000; SANDHU et al. 2001; SUN et al. 2001; TANG; HOU 2001; DEVI et al. 2003; WANG; LEGER 2006; KALVNADI et al., 2018).

2.9 Interações entre fungos entomopatogênicos e insetos entomófagos

Os fungos entomopatogênicos possuem vantagens que favorecem seu desenvolvimento como agentes de controle biológico, por representarem risco mínimo para organismos benéficos não alvos, como abelhas, minhocas e colêmbolos, e inimigos naturais, como vespas parasitas, besouros predadores e crisopídeos (PESSOA et al. 2005; CARDOSO et al., 2007; POTRICH et al., 2009; POLANCZYK et al., 2010; LACEY et al., 2015; CONSCECHI 2017; PORTILLA et al., 2017; DIAS et al., 2019).

Embora o uso de fungos entomopatogênicos seja considerado seguro em relação ao meio ambiente, são necessárias pesquisas que comprovem a segurança ou o impacto que determinado microrganismo entomopatogênico possa causar sobre outros inimigos naturais (MILNER, 1997; LOUREIRO; MOINO JUNIOR, 2007).

Produtos à base de fungos entomopatogênicos demonstram um constante crescimento no mercado de insumos agrícolas (MAPA, 2019), o que desperta a preocupação sobre os possíveis efeitos em organismos não alvos, pois, estes fungos apresentam uma vasta gama de hospedeiro incluindo inimigos naturais (POTRICH et al, 2009; POLANCZYK et al, 2010).

Estudos demonstraram que os fungos entomopatogênicos podem causar impacto sobre o desenvolvimento de predadores e outros insetos não-alvo (ALVES, 1998; LOUREIRO; MOINO JUNIOR, 2007). Deste modo, estes agentes de controle biológico podem agir sinergicamente ou antagonicamente (PORTILLA et al., 2017b).

Interações entre agentes de controle microbiano e organismos não-alvo podem acontecer através da infecção direta, porém esses efeitos podem ser evitados ou

minimizados através da seleção cuidadosa de patógenos específicos (GOETTEL; HAJEK, 2001). Estudos com fungos entomopatogênicos em interação com *C. externa* realizados no Brasil indicam a possibilidade de aplicação simultânea destes inimigos naturais, propiciando a associação de práticas para o manejo eficiente de pragas (SCHILICK et al., 2015; PESSOA et al., 2005; GENEROSO, 2002; DIAS et al., 2019).

O sucesso dos programas de controle biológico depende do entendimento mais complexo entre os hospedeiros e o terceiro nível trófico, principalmente em relação aos inimigos naturais como predadores e parasitoides (MAGALHÃES et al., 1998). Os estudos de interações entre entomopatógenos e insetos entomófagos podem ser analisadas de diversas maneiras, pois esses microrganismos podem prejudicar ou não inimigos naturais, e isto depende do tipo de patógeno, concentração e espécie de inimigo natural e forma de exposição (SANTORO et al., 2007; ROSSI-ZALAF et al., 2008).

As pesquisas que investigam os efeitos diretos e indiretos dos entomopatógenos sobre predadores e parasitoides estão relacionados às aplicações diretas das suspensões fúngicas sobre os insetos, onde implicações negativas estão correlacionadas com as altas dosagens (PORTILLA et al., 2017b). As interações, aliados à utilização de fungos entomopatogênicos com ação endofítica, principalmente dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, têm tido respostas satisfatórias na redução das populações de pragas, efeito fisiológico benéfico para o desenvolvimento das plantas hospedeiras e sinergismo entre os predadores e parasitoides (CANASSA et al., 2019; GONZÁLEZ-MAS et al. 2019).

A interação positiva propõe a ação conjunta de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. rileyi* e *C. externa* ao considerar um programa de controle biológico baseado na aplicação dos entomopatógenos e liberação massiva do predador simultaneamente. Ao pontuar os benefícios deste sinergismo podemos considerar as vantagens dos fungos entomopatogênicos em relação aos outros microrganismos: age via contato permitindo a ação em diversos estágios de desenvolvimento do inseto, largo espectro de espécies suscetíveis, causam epizootias, alta capacidade de disseminação e mecanismos de sobrevivência permitindo maior persistência no ambiente (SUJJI et al., 2002; ALVES;

LOPES 2008). Combinada a ação dos fungos na redução populacional de *H. armigera*, o *C. externa* atua de forma conjunta alimentando-se de ovos e pequenas lagartas presentes na área. É importante validar a ação de um inimigo natural sobre ovos de lepidópteros-pragas considerando a redução de problemas futuros com a eclosão e desenvolvimento das lagartas alimentando-se das plantas hospedeiras e principalmente na redução populacional da espécie-praga.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar as interações entre o predador *C. externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03), para o controle de *H. armigera*.

4 HIPÓTESES

- 1- Os isolados dos fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03), apresentam virulência sobre lagartas de 1^o ao 5^o instar de *H. armigera*;
- 2- Os fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03) são seletivos sobre larvas de 1^o, 2^o e 3^o instar de *C. externa*;
- 3- Os isolados dos fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03), não interferem negativamente no potencial predatório de *C. externa*;
- 4- Suspensões fúngicas com maior concentração de conídios, não reduz a capacidade predatória de *C. externa*;
- 5- Larvas de *C. externa* não diferenciam presas infectadas ou isentas de fungos entomopatogênicos durante (0, 24 e 48 h) de exposição;
- 6- O tempo de exposição dos fungos sobre as presas, não reduz a capacidade de consumo de *C. externa*;

7- Existe interação positiva entre *C. externa* e os isolados avaliados;

8- Há possibilidade de utilização simultânea destes agentes de controle natural para redução populacional de *H. armigera*;

9- As metodologias de exposição (DA ou DF), não interferem na ação do fungo entomopatogênico em relação à espécie-praga, ao predador e sua capacidade predatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBUQUERQUE, S.A. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 23, p.969-1022.

ALBUQUERQUE, D. F. de A.; CRUZ, I. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) tendo como fonte de alimento ovos de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR, 2017, Sete Lagoas. [Trabalhos apresentados]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. (Ed.), pp. 289-381. In: **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq. Brasil, 1998.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. FEALQ, Piracicaba, 2008.

AGRAWAL, A.; RAJAMANI, V.; REDDY, V. S.; MUKHERJEE, S. K.; BHATNAGAR, R. K. Transgenic plants over-expressing insect-specific microRNA acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: an alternative to Bt-toxin technology. **Transgenic Research**, v. 24, p. 791-801, 2015.

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

ARMAS, F. S DE ; GRÜTZMACHER, A. D.; NAVA, D. E.; RAKES, M.; BUENO, AMARAL, F.; PASINI, R. A. Selectivity of pesticides used in peach orchards to eggs and pupae of the predators *Chrysoperla externa* and *Coleomegilla quadrifasciata*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 1427-1440, 2019.

AUAD, A.M. Desenvolvimento das fases imaturas, aspectos reprodutivos e potencial de predação de *Chrysoperla externa* (Hagen) alimentadas com ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n.2, p.327-334, 2005.

AUAD, A.M.; TOSCANO, L.C.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; FREITAS, S. Aspectos biológicos dos estádios imaturos de *Chrysoperla externa* (Hagen) e *Ceraeochrysa cincta*

(Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentados com ovos e ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.6, p.429-432, 2001.

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

BAKHSH, A.; KHABBAZ, S. D.; BALOCH, F. S.; DEMIREL, U.; ÇAL ŞKAN, M. E.; HATIPOĞLU, R.; ÖZCAN, S.; ÖZKAN, H. Insect-resistant transgenic crops: retrospect and challenges. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 39, p. 531-548, 2015.

BEZERRA, C.E.S.; NOGUEIRA, C.H.F.; SOMBRA, K.D.S.; DEMARTELAERE, A.C.F.; Araujo E.L. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae): Aspectos biológicos, potencial de utilização e perspectivas futuras. **Revista Caatinga**, v.22, n.3, p.1-5, 2009.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I. NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A.; (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola VIII**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2015. p. 161-179.

BORTOLI, S. A.; CAETANO, A. C.; MURATA, A. T.; OLIVEIRA, J. E. M. Desenvolvimento e Capacidade Predatória de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) em Diferentes Presas, **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 6, n.1, 2006.

BUENO, A.F.; CARVALHO, G.A.; DOS SANTOS, A.C.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, D.M.D. Pesticide selectivity to natural enemies: Challenges and consisoladots for research and field recommendation. **Ciência Rural**, 47, 1–10, 2017.

CABI - Centre for Agriculture and Biosciences International. *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm): Invasive Species Compendium, 2016. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/26757>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

CAETANO, A. C. Estudo da Capacidade de Consumo de *Chrysoperla externa* (Neuroptera : Chrysopidae) em diferentes condições de laboratório. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5, 1996, Foz do Iguaçu-PR. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO/Conselho Brasileiro de Fitossanidade, 1996.

CANARD, M.; PRINCIPI, M.M. Life histories and behavior. In: CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R.(eds). *Biology of Chrysopidae*. The Hague-NL: W. Junk Publishers, 1984. p.57-149.

CABI; EPPO - Centre for Agriculture and Biosciences International; European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Helicoverpa armigera* Bulletin, Data Sheets on Quarantine Pests, n. 110, p. 159-164, 1992.

CARNEIRO, E.; SILVA, L.; MAGGIONI, K.; SANTOS, V.; RODRIGUES, T.; REIS, S.; PAVAN, B. Evaluation of insecticides targeting control of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 2823-2828, 2014.

CARDOSO, E.R.; FREITAS, S.; NUNES, H.T.; PESSOA, L.G.A. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* para larvas de primeiro instar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.29, n.4, p.563-568, 2007.

CANASSA, F.; TALL, S.; MORAL, R. A. LARA, I. A.R. DE; DELALIBERA JR, I.; MEYLING, N. V. Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. **Biological Control**, v.132, p.199–208, 2019.

CONSECHI, M.R. Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o manejo de *Diaphorina citri* Tese (Doutorado)- USP/ Escola Superior “Luiz de Queiroz” 2017, 134 p. (In Portuguese).

CORTES, A. J. Relatório da actividade do aluno estagiário do curso de Eng. Agrónomo, ISA/UTL, Lisboa, 1972.

COSTA, V. H. D.; SOARES, A. M.; RODRIGUEZ, F. A. D.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, I. M.; VALICENTE, F. H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. *Florida Entomologist*, v. 98, n. 2, p.796-798, 2015.

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

DEGRANDE, P. E.; OMOTO, C. Pragas: estancar prejuízos. **Revista Cultivar**, v. 15, p. 30-34, 2013.

DEVI, P.S.S.; PRASAD, Y.F.; CHOWDARY, D.A.; RAO, L.M.; BALAKRISHNAN, K. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F)

Samson is the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Mycopathologia**, 56, 365–373, 2003.

DIAS, P.M.; LOUREIRO, E.S.; AMARAL, F.A.; PESSOA, L.G.A.; TOSTA, R.A.S.; KOWALSKI, R.L. Epizootia de *Metarhizium rileyi* (Far) em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho convencional. In: 11° ENEPEX UFGD- 8° EPEX UEMS, Cassilândia, MS, 2017.

DIAS, P. M. OLIVEIRA NETO, F. M.; LOUREIRO, E. S.; PESSOA, L. G. A.; DEVOZ, G.L. R. Potencial de Uso de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) Alimentada com *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em Sistemas Agroecológicos. **Cadernos de Agroecologia**. v. 13, n. 2, p. 1-10, 2018.

DIAS, P. M.; LOUREIRO, E. DE S.; PESSOA, L. G. A.; MATEUS, M. P. DE B.; TOSTA, R. A. DE S.; OLIVEIRA NETO, F. M. DE; DEVOZ, G. L. R. EPIZOOTIA DE *Metarhizium rileyi* EM *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM CULTIVO DE SOJA. 71ª Reunião Anual da SBPC 21 - 27 de Julho de 2019. UFMS Campo Grande / MS. **Anais...** Campo Grande, MS, 2019.

DIAS, P.M.; LOUREIRO, E.S.L.; PESSOA, L.G.A; OLIVEIRA NETO, F.M.; TOSTA, R.A.S.; TEODORO, P.E. Interactions between Fungal-Infected *Helicoverpa armigera* and the Predator *Chrysoperla externa*. **Insects**, 10, 1-11, 2019.

DIAS, P.M.; WERNER, A. M.; LOUREIRO, E. DE S.; PESSOA, L. G.; TOSTA, R. A. DE S. Enzoootia de *Metarhizium rileyi* em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja. I Semana de Estudos Acadêmicos do CPCS- 17 a 19 de Outubro de 2018- UFMS- Chapadão do Sul / MS, Brasil, p. 33.

DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, 2010.

DRAKE, V. A. Methods for studying adult movement in *Heliothis*. In: ZALUCKI, M. P (Ed.). **Heliothis: research methods and prospects**. New York: Springer-Verlag, 1991, p. 109-121.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Folder- *Helicoverpa armigera* e outros desafios do manejo de pragas na cultura da soja. Embrapa Soja, Londrina PR, 2013.

FARIA, M.R.D., Wraight, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, 43, 237–256, 2007.

FATHIPOUR Y; SEDARATIAN A. Manejo integrado de sistemas de cultivo de soja *Helicoverpa armigera*. Em: ELSHEMY HA (ed). **Resistência a pragas de soja**. Cairo: InTeOpP. p.231-280, 2013.

FERREIRA, M. R. **Cinética do desenvolvimento de *Heliothis armigera***. Universidade de Évora, Évora, 75 p. (1989).

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

FITT, G.P. do. A ecologia das espécies de *Heliothis* em relação aos agroecossistemas. Revisão Anual da Entomologia 34: 17-52, 1989.

FITT, G.P.; WILSON, L.J. Engenharia genética em MIP: algodão *Bt*, em: KENNEDY GG; SUTTON TB (eds). *Tecnologias Emergentes em Manejo Integrado de Pragas: Conceitos, Pesquisa e Implementação*. APS Press: St Paul, EUA. p.108-125, 2000.

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

FREITAS, S. **Criação de crisopídeos em laboratório**. Jaboticabal-SP: Funep, 2001, n.300, 20 p.

GENEROSO, A.R. Compatibility of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* with *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and Methodology for Evaluating Selectivity. Master's Thesis (Master in Entomology), Paulista State University, Jaboticabal-SP, Brazil, 2002; p. 63.

GONZÁLEZ-MAS, N., CUENCA-MEDINA, M., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, F. GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ; E. QUESADA-MORAGA. Efeitos bottom-up de *Beauveria bassiana* endofítica nas interações multitróficas entre o pulgão-do-algodoeiro, *Aphis gossypii* e seus inimigos naturais no melão. **Journal Pest Science**, v. 92, n.3, 1271-1281, 2019.

GOETTEL, M.S.; HAJEK, A.E. Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods, p.81-97. In E. Wajnberg, J.K. Scott & P.C. Quimby (eds.), **Evaluating indirect ecological effects of biological control**. CAB, 2001, 261p.

HARDWICK, D. F. The corn earworm complex. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 40, p. 1-247, 1965.

HOLDOM, D.G. VAN DE KLASHORST, G. Sporulation by hyphal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, 242-245, 1986.

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

HEWLETT, J. A., SZCZEPANIEC, A.; EUBANKS, M. D. The effects of sugarcane aphid density in sorghum on predation by lady beetles and lacewings. **Biological Control**, v. 129, 171-177, 2018.

IRAC. Michigan State University. Arthropod pesticide resistance database. 2016. Disponível em :><http://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=41>> Acesso em: (12 de Agosto de 2019).

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

KALVNADI, E.; MIRMOAYEDI, A.; ALIZADEH, M.; POURIAN, H.R. Sublethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, increase the costs of physical conditioning of pups of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 158, 32-42, 2018.

KHAN S.; GUO, L.; MAIMAITI, Y.; MIJIT, M.; QIU, D. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. **Mol Plant Breed**, v.3, 63-79, 2012.

LACEY, L.A., GRZYWACZ, D., SHAPIRO-ILAN D.I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M., GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.132, 1-41, 2015.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. **Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808)**. Geertjesweg: Netherlands Plant Protection Service/ Sand Hutton: The Netherlands and Central Science Laboratory, 2007. 18p. (Plant Protection Service/Central Science Laboratory. Report).

LEBRE, V. P.; MONTES, S. M. N. M.; FREITAS, S.; CERÁVOLO, L. C.; PONTES, R. M. de O. Levantamento de crisopídeos em pomar de acerola (*Malphigia emarginata* Dc.) no Oeste do estado de São Paulo. In: Simpósio de Controle Biológico, 10, 200 7, Brasília. **Anais...** Sociedade Entomológica do Brasil. Entomologia.

LIMA, A. R.; LOUREIRO, S. L.; MUCHALAK, F.; TAIRA, T. L.; FERREIRA, F. N.; NOCCHI, M. J.; Ocorrência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson na *Spodoptera cosmioides* (Walk.) 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) em Chapadão do Sul-MS. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.9, n.2, 57-59, 2015.

LOUREIRO, E.S.; MOINO JUNIOR, A. Patogenicidade de Fungos Entomopatogênicos a *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) **BioAssay**, v.2, 2007.

LOUREIRO, E.S.; PESSOA, L.G.A.; DIAS, P.M.; RIBEIRO, M.P.; TOSTA, R.A.S.; TEODORO, P.E. Hydration levels on conidial production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycota) in solid growing medium. **Revista de Agricultura Neotropical** v. 6, 19-23, 2019.

LIU, X. D.; ZHAI, B. P.; ZHANG, X. X.; ZONG, J. M. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, v.30, n. p.307-315, 2005.

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

MAGALHÃES, B.P.; MONNERAT, R.; ALVES, S.B. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998, p.207-210.

MAIA, W. J. M. S. CARVALHO, C. F.; SOUZA, B.; CRUZ, I.; MAIA, T.J.A.F. *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, 1259-1268, 2004.

MARTIN, T.; OCHOU, G. O.; DJIHINTO, A.; TRAORE, D.; TOGOLA, M.; VASSAL J. M.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Controlling an insecticide-resistant bollworm in West Africa. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 107, 409-411, 2005.

MATTHEWS, M. Classification of the Heliiothinae. **Bulletin of the Natural Resources Institute**, Chatham, v. 82, p. 287-291, 1992.

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

McCAFFERY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 353, p. 1735-1750, 1998.

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

MILNER, R.J. Prospects for biopesticides for aphid control. **Entomophaga**. v.42, p. 227-239, 1997.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: AGROFIT- Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: (21 de Novembro 2019).

MITTER, C.; POOLE, R. W.; MATTHEWS, H. Biosystematics of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 207-225, 1993.

MORA, M.A.E.; CASTILHO. A.M.C.; FRAGA, M.E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, p,1-10, 2017.

MURATA, A, T.; CAETANO, A, C.; BORTOLI, S, A.; BRITO, C, H, Capacidade de consumo de *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes presas, **Caatinga**, v,19, n,3, p,304-309, 2006.

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

OSWALD, J. D. Neuropterida Species of the World, 2018. Disponível em:<<http://lacewing.tamu.edu/SpeciesCatalog/Main>>. Acesso em: (14 Outubro 2019).

PASINI, R.A. Seletividade de agrotóxicos utilizados na cultura do trigo aos predadores *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) e *Eriopis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Coccinellidae) em condições de laboratório e semi-campo. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas RS, 2017, 154 p. (In Portuguese).

PESSOA, L. G. A. Cavalcanti, R. S.; Moino Júnior, A.; Souza, B. Compatibilidade entre *Beauveria bassiana* e o predador *Chrysoperla externa* em laboratório. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 617-619, jun. 2005.

PESSOA, L. G.A.; FREITAS, S.; LOUREIRO, E.S. Desenvolvimento pós-embrionário de *Ceraeochrysa cincta* (Schneider, 1851) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com ovos de *Diatraea saccharallis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae): **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR: v, 31, suplemento 1, p, 1355-1360, 2010.

PELL, J.K.; EILENBERG, J.; HAJEK, A.E.; STEINKRAUS, D.C. Biology, ecology and pest management potential of *Entomophthorales*. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI, Wallingford, 2001, pp 71–153.

PESSOA, L.G.A.; LEITE, M.V.de; FREITAS, S.; GARBIN, G.C. Efeito da variação da temperatura sobre o desenvolvimento embrionário e pós embrionário de *Ceraeochrysa paraguayia* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae) **Arq. Inst. Biol.** v.71, n.4, 473-476, 2004.

PITWAK, J.; MENEZES JR., A. O.; VENTURA, M. U. Development and reproductive performance of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) using preys from wheat crop. **Rev. Colomb. Entomol.** v. 42, n.2, 118-123, 2016.

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

POLANCZYK, R.A.; PRATISSOLI, D.; DALVI, L.P.; GRECCO, E.D.; FRANCO, C.R.; 2010. Efeito de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorokin nos parâmetros biológicos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman e Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n.6, 1412-1416, 2010.

POTRICH, M; ALVES, L.F.A.; HAAS, J.; SILVA, E.R.L. DA; DAROS, A.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P.M.O.J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, 822-826, 2009.

PORTILLA, M.; LUTTRELL, R.; SNODGRASS, G.; ZHU, Y. C.; RIDDICK, E. Letalidade da entomopatogênico fungo *Beauveria bassiana* NI8 Isolado em *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) e seu impacto possível sobre benéficos Artrópodes. **Journal of Entomological Science**, v.52, n. 4, pp. 352-369. 2017a.

PORTILLA, M. SNODGRASS, G., LUTTRELL, R. Lethal and Sub-Lethal Effects of *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) Isolado NI8 on *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). **Florida Entomology**, v. 100, p,627-633, 2017b.

PRATISSOLI, D.; LIMA, V.L.; PIROVANI, V.D.; LIMA, W.L. Ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em tomateiro no estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira** v. 33, 101–105, 2015.

QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T. *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus for the enhanced bio-control of *Helicoverpa armigera*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 17, 1043-1048, 2015.

RAHMAN, A. K. M. Z.; HAQUE, M. A.; ALAM, S. N.; BEGUM, K.; SARKER, D. Development of integrated pest management approaches against *Helicoverpa armigera* (Hübner) in tomato. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 41, p. 287-296, 2016.

RIBEIRO, M. J. **Biologia de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera, Chrysopidae) alimentada com diferentes dietas**. 1988, 131 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 1988.

RÍOS-MORENO, A., QUESADA-MORAGA, E. e Garrido-Jurado, I. Tratamentos com estirpes de *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 e EAMa 01/58-Su (Ascomycota: Hypocreales) são de baixo risco para o predador generalista *Chrysoperla carnea*. **Journal Pest Science**, v.91, n.385- 394, 2017.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 63-71, 2006.

ROSSI-ZALAF, L. S.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA, S.N.; TANZINI, M.R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S. B.; LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina, Avanços e Desafios, v.14. Piracicaba, FEALQ, 414p. 2008

SANDHU, S.S.; UNKLES, S.E.; RAJAK, R.C.; KINGHORN, J.R. Generation of Benomyl resistant *Beauveria bassiana* isolados and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, 245-250, 2001.

SANDHU, S.S., SHARMA, A.K.; BENIWAL, V.; GOEL, G.; BATRA, P., KUMAR, A.; MALHOTRA, S. Micocontrole de pragas de insetos: fatores envolvidos, mecanismo e regulação. **Journal of Pathogens**, v.1, 1-10, 2012.

SANTORO, P. H. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 4, 483-489, 2007.

SANTOS, T. M. DOS; A. L. B. BOIÇA JUNIOR, J. J. SOARES. Influência de tricomas do algodoeiro sobre os aspectos biológicos e capacidade predatória de *Chrysoperla externa* (Hagen) alimentada com *Aphis gossypii* Glover. **Bragantia**, v. 14, n. 7, p.243–254. 2003.

SARWAR, MK, AZAM, I, IQBAL W, IRAM, N., RASHDA A, ANWER F, ATTA K E ALI R. Cotton aphid *Aphis gossypii* L. (Homoptera; Aphididae); a challenging pest; biology and control strategies: a review. **Int J Appl Biol Pharm Technol**, v. 5, p. 288-294, 2014.

SARWAR M, M.; AHMAD, N.; TOUFIQ, M. Host plant resistance relation ships in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against gram pod borer (*Helicoverpa armigera* Hubner). **Pakistan Journal of Botany** v, 41, 3047-3052, 2009.

SILVA, B. K. DE A.; GODOY, M. S. DE; LIMA, A. G. DE; OLIVEIRA, A. K. S. DE; PASTORI, P.L. Toxicity of insecticides used in muskmelon on first-instar larvae of *Chrysoperla genanigra* Freitas (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Caatinga** v.30, n.3, 662-669, 2017.

SEDARATIAN, A.; FATHIPOUR, Y.; TALAEI-HASSANLOUI, R. Deleterious effects of *Bacillus thuringiensis* on biological parameters of *Habrobracon hebetor* parasitizing *Helicoverpa armigera*. **BioControl**, v. 59, 89-98, 2014.

SILVA, C. G.; SOUZA, B.; AUAD, A. M.; BONANI, J. P.; TORRES, L. C.; CARVALHO, C. F.; ECOLE, C. C. Desenvolvimento das fases imaturas de *Chrysoperla externa* alimentadas com ninfas de *Bemisia tabaci* criadas em três hospedeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1065-1070, 2004.

SILVA, R. L. X. **Aspectos bioecológicos e determinação das exigências térmicas de *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1961) (Neuroptera: Crisopidae) em laboratório.** 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

SOUZA, B. **Estudos morfológicos do ovo e da larva de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) e influência de fatores climáticos sobre a flutuação populacional de adultos em citros.** 1999. 141p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1999.

SUJII, E.; CARVALHO V.; TIGANO, E. Cinética da Esporulação e Viabilidade de Conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre Cadáveres da Lagarta-da-Soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), em Condições de Campo. **Neotropical Entomology**. v. 31, n.1, 85-90, 2002.

SUN, L.J.; WU, K.M.; GUO, Y.Y. The pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Helicoverpa armigera* under different temperatures and humidities. **Acta Entomologica Sinica**, v. 44, 501-506, 2001.

SUZANA, C.S.; DAMIANI, R.; FORTUNA, L.S.; SALVADORI, J.R. Performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on different food sources. **Pesq. Agropecu. Trop.**, v. 45, 480–485, 2015.

SCHLICK, E.C.; L.C. TOSCANO, G.D. SOUZA; A.J.A. PERES; P.M. DIAS & W.I. MARYAMA. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) com *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **EntomoBrasilis**, v. 8, n.3, 189-195, 2015.

SHANG Y, FENG P, WANG C. Fungi That Infect Insects: Altering Host Behavior and Beyond. **PLoS Pathog.**, v.11, n.8, 2015.

SMITH, R. C. The biology of Chrysopidae. Mem. **Cornell University Agricultural 41 Experiment Station bulletin**, Ithaca-NY, v. 58, 1278-1380, 1922.

TANG, G.; HOU, R. Effects of environmental factors on the virulence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, against the ear of corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep. Noctuidae). **J. Appl. Entomol.**, v.125, 243–248, 2001.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, v.8, n.11, p.1-7 2013.

VEGA, F. E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review, **Mycologia**, v.110, n.1, p.4-30, 2018.

XIONG, Y.; ZENG, H.; ZHANG, Y.; XU, D.; QIU, D. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* Development. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, 370-381, 2013.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A; CRUZ, I. **Manejo de pragas do sorgo**. Sete Lagoas-MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 25 p. (Circular técnica nº 27).

WANG, N.C.; LI, Z.H. Estudos sobre a biologia da lagarta do algodão (*Heliothis armigera* Hübner) e lagarta do tabaco (*Heliothis assulta* Quenee). **Jornal da Universidade Agrícola de Shandong** 1-2: 13-25, 1984.

WANG, C.; ST LEGER, R.J. The collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.103, 6647–6652, 2006.

WANG, Z.Y.; He, K.L.; Zhan, F.; Lu, X.; Babendreier, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of maize in China. **Biological Control**, v. 68, 136–144, 2013.

ZHU, H.; KIM, J.J Disseminação de conídios de *Beauveria bassiana* orientada para o alvo pelos predadores *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) e *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) para biocontrole de *Myzus persicae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, 393-406, 2012.

Capítulo I²
**Fungos entomopatogênicos no manejo de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:
Noctuidae)**

² Este capítulo segue as normas da revista *Insects*.

1 Article

2 Fungos entomopatogênicos no manejo de *Helicoverpa* 3 *armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

4 **Resumo:** A *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de importância agrícola no
5 Brasil e no mundo, com danos associados à diversas culturas. Este trabalho teve como objetivo
6 avaliar a virulência de *Beauveria bassiana* (ESALQ PL63), *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9) e
7 *Metarhizium rileyi* (UFMS 03), sobre cinco instares larvais (L1, L2, L3, L4 e L5) de *H. armigera*. Os
8 tratamentos foram: controle (água destilada esterilizada + 0.001% Tween80®) (T1); *B. bassiana* (T2);
9 *M. anisopliae* (T3) e *M. rileyi* (T4), nas concentrações: (1×10^7 ; 1×10^8 e 1×10^9 conídios mL⁻¹). Os
10 tratamentos foram aplicados através da torre de Potter adaptada utilizando duas metodologias de
11 aplicação: aplicação direta (DA) e filme seco (DF). Os resultados indicam que os isolados testados
12 proporcionaram baixa mortalidade sobre os estágios larvais de *H. armigera* (L1, L2, L3, L4 e L5). Os
13 fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) e
14 *M. rileyi* (isolado UFMS 03) nas concentrações (1×10^7 , 1×10^8 ou 1×10^9 con.mL⁻¹) não foram
15 virulentos às lagartas de *H. armigera*. Houve crescimento micelial sobre todos os cadáveres do
16 tratamento *B. bassiana*

17 **Palavras-chave:** Hypocreales, lagarta do velho mundo, *Glycine max*, controle biológico, controle
18 microbiano, entomopatogênicos, *Beauveria*, *Metarhizium*

19 1. Introdução

20 A lagarta do velho mundo *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae),
21 considerada anteriormente no Brasil uma praga quarentenária foi relatada pela primeira vez em
22 regiões brasileiras no ano agrícola 2013/2014 e proporcionou perdas em produtividade de diversas
23 culturas de importância econômica [1-2].

24 O controle químico tem sido a principal estratégia de manejo para *H. armigera* em diferentes
25 sistemas de cultivo [3]; e este fato está correlacionado à ideia de menor custo de produção, falta de
26 informações idôneas sobre o manejo integrado de pragas (MIP) e as possibilidades de
27 aplicabilidade no campo [4].

28 Os fungos entomopatogênicos são um conjunto diversificado de espécies com um aspecto em
29 comum: infectam e causam doenças em artrópodes [5]. Os gêneros *Aspergillus*, *Beauveria*,
30 *Metarhizium*, *Cordyceps*, *Isaria* e *Pandora* destacam-se como agentes no controle microbiano de
31 artrópodes-pragas [6].

32 Estudos com fungos entomopatogênicos no controle de pragas em condições de laboratório e
33 de campo, demonstraram que isolados das espécies: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium*
34 *anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson apresentam alta virulência sobre
35 diferentes instares larvais de *H. armigera* [7- 14].

36 Epizootias de fungos entomopatogênicos são observadas frequentemente entre populações de
37 insetos, e este fenômeno caracteriza o grande potencial desses microrganismos para a redução de
38 populações de pragas [15]. O primeiro relato da ação natural de fungo entomopatogênico *M. rileyi*
39 sobre *H. armigera* no Brasil foi em cultivo de algodão, no ano de 2015 [16]. Para o estado de Mato
40 Grosso do Sul são relatadas epizootias e enzootias de *M. rileyi* sobre *H. armigera* em soja durante as
41 safras de 2017/2018 e 2018/2019 [17-18].

42 Embora existam relatos da ação natural de *M. rileyi* sobre *H. armigera*, este fungo não possui
43 formulação comercial com estudos satisfatórios para produção do mesmo em arroz e diferentes
44 níveis de hidratação [19-20]. A produção, armazenamento e formulação em massa *in vitro* dos
45 fungos entomopatogênicos são fatores que têm restringido seu incremento como agentes de
46 controle biológico [21].

47 A agricultura atual incrementou a utilização dos fungos entomopatogênicos no manejo
48 integrado, devido ao grande potencial que estes microrganismos apresentam para redução de
49 populações de artrópodes-pragas [22], e por não causarem danos à saúde humana e aos
50 ecossistemas [23].

51 Diante da importância das espécies fúngicas como agentes de controle biológico de pragas
52 agrícolas, este estudo teve por objetivo avaliar a patogenicidade de *Beauveria bassiana* (ESALQ
53 PL63), *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9) e *Metarhizium rileyi* (UFMS 03), sobre larvas de primeiro,
54 segundo, terceiro, quarto e quinto instar de *H. armigera*.

55 2. Material e Métodos

56 2.1 Obtenção dos fungos entomopatogênicos

57 Foram utilizados os formulados comerciais à base dos fungos *Beauveria bassiana* (isolado
58 ESALQ PL63) (BOVERIL®) e *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ E9) (METARRIL®). O
59 *Metarhizium rileyi*, não possui formulação comercial disponível, sendo que o isolado UFMS 03
60 pertence ao banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de
61 Mato Grosso do Sul, Campus de Chapadão do Sul, MS, Brasil e foi produzido em meio de cultura
62 Sabouraud de acordo com a metodologia de Loureiro et al.[20].

63 2.2 Obtenção e criação massal de *Helicoverpa armigera*

64 Para o estabelecimento da criação massiva foram coletados adultos e lagartas de *H. armigera*
65 de diferentes idades em cultivo de soja na safra 2017/2018 e 2018/2019, isentas de pulverizações com
66 produtos fitossanitários químicos, em área pertencente à área Experimental da Universidade
67 Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Chapadão do Sul, MS, Brasil.

68 Em condição de laboratório sob, temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa (UR) de $70\pm 10\%$ e
69 fotoperíodo de 12 horas (luz e escuro =L:D), as lagartas foram mantidas em unidades de criação do
70 tipo plástico com capacidade para 16 indivíduos, de acordo com Dias et al. (2019) [24] e receberam
71 diariamente dieta artificial a base de feijão branco, adaptada de GREENE et al.,(1976) [25]. As pupas
72 de *H. armigera* foram separadas por sexo e após a emergência dos adultos e alocados em gaiolas
73 totalizando 8 casais/gaiola [26-27].

74 2.3 Bioensaios

75 Os bioensaios foram conduzidos em laboratório sob condições de temperatura de 25 ± 1 °C, UR
76 de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas (L: D). As posturas provenientes de criação massiva foram
77 separadas para a montagem do experimento e após à eclosão, as lagartas de *H. armigera* com
78 tamanho de (1-3 mm) foram individualizadas em placas de Petri®, onde foram mantidas separadas
79 e alimentadas com dieta artificial até o estágio larval referente às aplicações. Para o preparo das
80 suspensões fúngicas foram realizadas diluições de (1 grama) de cada isolado em água destilada e
81 esterilizada + 0.01% (v/v) Tween80®, posteriormente foi realizada a contagem dos conídios com
82 auxílio de câmara de Neubauer, counting chamber, (Boeco®), Lab-Líder, Ribeirão Preto, SP, Brazil,
83 com finalidade de padronização das concentrações [28].

84 Os tratamentos foram constituídos: (T1) controle (água destilada esterilizada + Tween80®); (T2)
85 *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63); (T3) *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9); (T4) *M. rileyi* (isolado
86 UFMS 03), em diferentes concentrações: (1×10^7 ; 1×10^8 e 1×10^9 con. mL⁻¹), onde para cada suspensão
87 fúngica foi adicionado 1 mL de Tween80®. Às aplicações foram realizadas com auxílio de torre de

88 Potter adaptada, com um volume padrão de 2 mL/repetição, através de duas metodologias de
89 exposição: aplicação direta (DA), tratamentos aplicados diretamente sobre as lagartas e placas de
90 Petri® (arenas) [27], e a metodologia do filme seco (D.F.) com aplicação dos tratamentos somente
91 sobre as arenas, com a inserção das lagartas após a secagem do excesso de umidade [30], de acordo
92 com protocolo proposto pela “International Organization for Biological and Integrated Control of
93 Noxious Animals and Plants” (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS), com intuito de
94 padronizar os testes de seletividade de artrópodes a substâncias químicas e ou à entomopatógenos
95 [31].

96 Foram utilizadas lagartas de *H. armigera* de primeiro instar (L1), (>24 h) após à eclosão, lagartas
97 de segundo (L2), terceiro (L3), quarto (L4) e quinto (L5) instar, com (>24 h) após a mudança de
98 estágio larval.

99 As avaliações de mortalidade foram realizadas a cada 24 horas, com a mortalidade acumulada
100 à cada de 3 dias estendendo as avaliações até o 12º dia após as aplicações (DAA).

101 Para confirmação da mortalidade as lagartas mortas foram colocadas em câmara úmida com
102 intuito de permitir à conidiogênese sobre os cadáveres [32].

103 2.4 Análise estatística

104 Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial (4
105 × 3 × 2) com 4 tratamentos (P), três concentrações (C) e duas metodologias de aplicação (A). Foram
106 utilizadas 30 repetições compostas por 1 lagarta/instar de *H. armigera* para cada tratamento,
107 combinações de concentrações e metodologias de aplicação, totalizando 600 lagartas/ instar
108 incluindo o tratamento controle. O bioensaio foi replicado 3 vezes.

109 Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo
110 teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando o software Rbio [33].

111 3. Resultados

112 3.1. Mortalidade de primeiro instar de *Helicoverpa armigera*

113 Os produtos (P), os métodos de aplicação (A), as concentrações (C) e as interações (P×A, P×C,
114 A×C, e P×A×C) não influenciaram significativamente na mortalidade de *H. armigera* (L1) ao 3º, 6º, 9º
115 e 12º (DAA), ($p > 0.05$; Tabela 1).

116 **Tabela 1.** ANOVA de mortalidade de primeiro instar de *Helicoverpa armigera* infectada com
117 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C, RH de 70 ± 10% e
118 fotoperíodo de 12 horas (L:D)).

SV	DF	3º	6º	9º	12º
Product (P)	3	0.50 ^{ns}	0.52 ^{ns}	0.62 ^{ns}	0.75 ^{ns}
Application (A)	1	0.89 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.88 ^{ns}	0.75 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.95 ^{ns}	0.82 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.98 ^{ns}
A × P	3	0.88 ^{ns}	0.93 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.94 ^{ns}
A × C	3	0.99 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.99 ^{ns}
P × C	9	0.95 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.98 ^{ns}
A × P × C	9	1.00 ^{ns}	0.99 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
Residue	580	62.36	0.07	0.06	0.06

119 *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade pelo
120 teste F. FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade. Os números representam os valores de F.

121 Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. rileyi* nas condições testadas
122 proporcionaram baixa médias mortalidade de lagartas de primeiro instar (L1) de *H. armigera* em
123 relação ao controle, não apresentando diferenças significativas (Tabela 2).

124 A mortalidade das lagartas infectadas com *B. bassiana* foi confirmada pela esporulação
125 conidiogênese em todos os cadáveres.

126 **Tabela 2.** Médias (média ± erro padrão) de mortalidade de primeiro instar de *Helicoverpa armigera*
127 infectada com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o DAA,
128 (T: 25 ± 1°C. RH de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas (L:D)).

Product (P)	3 ^o	6 ^o	9 ^o	12 ^o
Control	0.03 ± 0.03 a	0.03 ± 0.03 a	0.03 ± 0.03 c	0.03 ± 0.03 a
<i>B. bassiana</i>	0.09 ± 0.02 a	0.09 ± 0.02 a	0.08 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a
<i>M. anisopliae</i>	0.07 ± 0.02 a	0.07 ± 0.01 a	0.06 ± 0.02 a	0.06 ± 0.02 a
<i>M. rileyi</i>	0.08 ± 0.02 a	0.08 ± 0.02 a	0.06 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a
Application (A)				
Direct (D.A.)	0.08 ± 0.01 a	0.08 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a	0.07 ± 0.01 a
Dry film (D.O.)	0.08 ± 0.01 a	0.08 ± 0.01 a	0.07 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a
Concentration (C)				
10⁷ con.mL⁻¹	0.09 ± 0.02 a	0.08 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a	0.06 ± 0.02 a
10⁸ con.mL⁻¹	0.09 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a	0.06 ± 0.02 a	0.06 ± 0.02 a
10⁹ con.mL⁻¹	0.08 ± 0.02 a	0.10 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a

129 Para cada fator com médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem
130 estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

131 3.2. Mortalidade de segundo instar de *Helicoverpa armigera*

132 Os produtos testados influenciaram na mortalidade de *H. armigera* (L2), onde esta variável diferiu
133 significativamente dos demais fatores apenas no 6^o (DAA) ($p < 0.05$; Tabela 3).

134 Os métodos de aplicação (A), as concentrações (C) e as interações (P×A, P×C, A×C, e P×A×C),
135 não influenciaram na mortalidade de *H. armigera* (L2) ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o (DAA), ($p > 0.05$; Tabela 3).

136 **Tabela 3.** ANOVA de mortalidade de segundo instar de *Helicoverpa armigera* infectada com *Beauveria*
137 *bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C, RH de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12
138 horas (L:D)).

SV	DF	3 ^o	6 ^o	9 ^o	12 ^o
Product (P)	3	0.15 ^{ns}	0.00 [*]	0.19 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Application (A)	1	0.90 ^{ns}	0.76 ^{ns}	0.76 ^{ns}	0.85 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.60 ^{ns}	0.94 ^{ns}	0.94 ^{ns}	0.97 ^{ns}
P×A	3	1.00 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.91 ^{ns}	0.96 ^{ns}
P×C	9	0.80 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.99 ^{ns}	1.00 ^{ns}
A×C	3	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.96 ^{ns}
P×A×C	9	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
Residue	580	0.10	0.07	0.07	0.05

139 *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade pelo
140 teste F. FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade. Os números representam os valores de F.

141 As medias de mortalidade foram significativamente iguais quando comparadas as
 142 metodologias de aplicação (A) e concentrações (C) (1×10^7 ; 1×10^8 e 1×10^9 con. mL⁻¹), até o 12º dia
 143 (DAA), no entanto, ao 6º (DAA), o fungo *B. bassiana* proporcionou maior mortalidade para *H.*
 144 *armigera* (L2), em relação às lagartas tratadas com *M. rileyi* (Tabela 4).

145 **Tabela 4.** Médias (média ± erro padrão) de mortalidade de segundo instar de *Helicoverpa armigera*
 146 infectada com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* ao 3º, 6º, 9º e 12º DAA,
 147 (T: $25 \pm 1^\circ\text{C}$. RH of $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas (L:D)).

Product (P)	3º	6º	9º	12º
Control	0.13 ± 0.00 a	0.05 ± 0.05 ab	0.05 ± 0.04 a	0.03 ± 0.04 a
<i>B. bassiana</i>	0.12 ± 0.00 a	0.13 ± 0.02 a	0.11 ± 0.02 a	0.07 ± 0.03 a
<i>M. anisopliae</i>	0.11 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 ab	0.05 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 a
<i>M. rileyi</i>	0.14 ± 0.00 a	0.04 ± 0.00 b	0.07 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
Application (A)				
Direct (D.A.)	0.11 ± 0.00 a	0.08 ± 0.02 a	0.08 ± 0.02 a	0.05 ± 0.02 a
Dry film (D.O.)	0.12 ± 0.00 a	0.07 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a	0.05 ± 0.02 a
Concentration (C)				
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.10 ± 0.02 a	0.07 ± 0.03 a	0.07 ± 0.03 a	0.05 ± 0.03 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.13 ± 0.00 a	0.09 ± 0.02 a	0.08 ± 0.03 a	0.06 ± 0.03 a
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.14 ± 0.00 a	0.07 ± 0.02 a	0.07 ± 0.03 a	0.05 ± 0.03 a

148 Para cada fator com médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem
 149 estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

150 A mortalidade das lagartas infectadas com *B. bassiana* foi confirmada pela conidiogênese em
 151 todos os cadáveres.

152 3.3. Mortalidade de terceiro instar de *Helicoverpa armigera*

153 Os produtos (P), os métodos de aplicação (A), as concentrações (C) e as interações (P×A, P×C,
 154 A×C, and P×A×C), não influenciaram significativamente na mortalidade de *H. armigera* (L3) ao 3º, 6º,
 155 9º e 12º (DAA), ($p > 0.05$; Tabela 5).

156 **Tabela 5.** ANOVA de mortalidade de terceiro instar de *Helicoverpa armigera* infectada com *Beauveria*
 157 *bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* (T: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, RH de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12
 158 horas (L:D)).

SV	DF	3º	6º	9º	12º
Product (P)	3	0.43 ^{ns}	0.50 ^{ns}	0.62 ^{ns}	0.70 ^{ns}
Application (A)	1	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.87 ^{ns}	1.00 ^{ns}
Concentration (C)	3	1.00 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.94 ^{ns}
P×A	3	1.00 ^{ns}	0.98 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.98 ^{ns}
P×C	9	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
A×C	3	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
P×A×C	9	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
Residue	580	0.08	0.07	0.06	0.06

159 *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade pelo
 160 teste F. FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade. Os números representam os valores de F.

161 As médias de mortalidade de *H. armigera* (L3), não diferiram entre os produtos (P), os métodos
 162 de aplicação (A), as concentrações (C) e as interações (P×A, P×C, A×C, e P×A×C), ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o
 163 (DAA), (Tabela 6).

164 **Tabela 6.** Médias (média ± erro padrão) de mortalidade de terceiro instar de *Helicoverpa armigera*
 165 infectada com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o DAA,
 166 (T: 25 ± 1°C. RH de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas (L:D)).

Product (P)	3 ^o	6 ^o	9 ^o	12 ^o
Control	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
<i>B. bassiana</i>	0.10 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
<i>M. anisopliae</i>	0.10 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
<i>M. rileyi</i>	0.10 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
Application (A)				
Direct (D.A.)	0.09 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
Dry film (D.O.)	0.09 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
Concentration (C)				
10⁷ con.mL⁻¹	0.10 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
10⁸ con.mL⁻¹	0.10 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a
10⁹ con.mL⁻¹	0.10 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a

167 Para cada fator com médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem
 168 estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

169 A mortalidade das lagartas infectadas com *B. bassiana* foi confirmada pela conidiogênese em
 170 todos os cadáveres e apenas dois de *M. rileyi*.

171 3.4. Mortalidade de quarto instar de *Helicoverpa armigera*

172 Entre os fatores avaliados, apenas as metodologias de exposição (A) dos tratamentos diferiram
 173 significativamente em relação à mortalidade do quarto instar de *H. armigera* (L4), ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o
 174 (DAA), ($p < 0.05$; Table 7)

175 **Tabela 7.** ANOVA de mortalidade de quarto instar de *Helicoverpa armigera* infectada com *Beauveria*
 176 *bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C, RH de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12
 177 horas (L:D)).

FV	DF	3 ^o	6 ^o	9 ^o	12 ^o
Product (P)	3	0.07 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.29 ^{ns}	0.61 ^{ns}
Application (A)	1	0.64 ^{ns}	0.03 [*]	0.58 ^{ns}	0.64 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.84 ^{ns}	0.61 ^{ns}	0.61 ^{ns}	0.94 ^{ns}
P×A	3	0.24 ^{ns}	0.88 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.98 ^{ns}
P×C	9	0.72 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.96 ^{ns}	1.00 ^{ns}
A×C	3	0.98 ^{ns}	0.62 ^{ns}	0.96 ^{ns}	0.98 ^{ns}
P×A×C	9	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
Residue	580	0.12	0.10	0.08	0.06

178 *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade pelo
 179 teste F. FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade. Os números representam os valores de F.

180 Os produtos (P) e concentrações (C) testados não apresentaram diferenças significativas entre
 181 as médias de mortalidade de *H. armigera* (L4) até o 12^o (DAA), porém a metodologia de exposição

182 filme seco (DF) ao 6º dia proporcionou menor média de mortalidade em relação à aplicação direta
183 (DA), (Table 8).

184 A mortalidade das lagartas infectadas com *B. bassiana* foi confirmada pelo crescimento micelial
185 sobre todos os cadáveres e 10% para *M. anisopliae*.

186 **Tabela 8.** Médias (média ± erro padrão) de mortalidade de quarto instar de *Helicoverpa armigera*
187 infectada com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* ao 3º, 6º, 9º e 12º DAA,
188 (T: 25 ± 1°C. RH of 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas (L:D)).

Product (P)	3º	6º	9º	12º
Control	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
<i>B. bassiana</i>	0.14 ± 0.00 a	0.13 ± 0.00 a	0.11 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
<i>M. anisopliae</i>	0.15 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
<i>M. rileyi</i>	0.17 ± 0.00 a	0.13 ± 0.00 a	0.11 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
Application (A)				
Direct (D.A.)	0.15 ± 0.00 a	0.14 ± 0.00 a	0.10 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
Dry film (D.O.)	0.13 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 b	0.09 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
Concentration (C)				
10⁷ con.mL⁻¹	0.17 ± 0.00 a	0.12 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
10⁸ con.mL⁻¹	0.13 ± 0.00 a	0.10 ± 0.00 a	0.12 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
10⁹ con.mL⁻¹	0.16 ± 0.00 a	0.14 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a

189 Para cada fator com médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem
190 estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

191 3.5. Mortalidade de quinto de *Helicoverpa armigera*

192 Os produtos (P), os métodos de aplicação (A), as concentrações (C) e as interações (P×A, P×C,
193 A×C, and P×A×C) não influenciaram significativamente na mortalidade de *H. armigera* (L5) ao 3º,6º,
194 9º e 12º (DAA), ($p > 0.05$; Tabela 9).

195 **Tabela 9.** ANOVA de mortalidade de quinto instar de *Helicoverpa armigera* infectada com *Beauveria*
196 *bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C, RH de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12
197 horas (L:D)).

SV	DF	3º	6º	9º	12º
Product (P)	3	0.54 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.35 ^{ns}
Application (A)	1	0.63 ^{ns}	0.76 ^{ns}	0.76 ^{ns}	0.87 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.94 ^{ns}	0.80 ^{ns}	0.89 ^{ns}	0.93 ^{ns}
P×A	3	0.98 ^{ns}	0.88 ^{ns}	0.94 ^{ns}	0.85 ^{ns}
P×C	9	0.99 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.99 ^{ns}
A×C	3	0.98 ^{ns}	0.95 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
P×A×C	9	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}
Residue	580	0.06	0.07	0.07	0.06

198 *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade pelo
199 teste F. FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade. Os números representam os valores de F.

200 As medias de mortalidade do quinto instar de *H. armigera* (L5) não foram influenciadas pelos
 201 tratamentos (P), métodos de aplicação (A), concentrações (C) e as interações (P×A, P×C, A×C, and
 202 P×A×C), ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o (DAA), (Tabela 10).

203 **Tabela 10.** Médias (média ± erro padrão) de mortalidade de quinto instar de *Helicoverpa armigera*
 204 infectada com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium rileyi* ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o DAA,
 205 (T: 25 ± 1°C. RH de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas (L:D)).

Product (P)	3 ^o	6 ^o	9 ^o	12 ^o
Control	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
<i>B. bassiana</i>	0.08 ± 0.00 a	0.10 ± 0.00 a	0.10 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a
<i>M. anisopliae</i>	0.07 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 a
<i>M. rileyi</i>	0.06 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
Application (A)				
Direct (D.A.)	0.07 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a
Dry film (D.O.)	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
Concentration (C)				
10⁷ con.mL⁻¹	0.08 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
10⁸ con.mL⁻¹	0.08 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a
10⁹ con.mL⁻¹	0.07 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 a

206 Para cada fator com médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem
 207 estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

208 A mortalidade das lagartas infectadas com *B. bassiana* foi confirmada pela conidiogênese em
 209 todos os cadáveres.

210 4. Discussão

211 De modo geral, os isolados dos fungos entomopatogênicos testados, nas diferentes
 212 concentrações e metodologias de exposição proporcionaram baixa virulência sobre os cinco instares
 213 larvais de *H. armigera*. A literatura descreve diversos fatores que podem interferir na
 214 patogenicidade e virulência dos fungos entomopatogênicos, dentre os quais podemos considerar
 215 como possíveis interferências neste estudo: variabilidade genética de cada isolado, característica
 216 inerente aos fungos entomopatogênicos em relação à produção de proteases, composição cuticular
 217 da espécie e espessura da cutícula [34-38].

218 Sabe-se que o modo de infecção dos fungos entomopatogênicos envolve os processos de
 219 adesão, germinação e penetração do patógeno sobre a cutícula do inseto, ultrapassando barreiras
 220 físicas e químicas [39-40]. As barreiras químicas são quebradas através da produção de proteases e
 221 quitinases com função degradadora da cutícula do hospedeiro [37, 41]. E a velocidade na qual a
 222 estrutura reprodutiva dos fungos ultrapassa à cutícula do hospedeiro varia de acordo com a
 223 espessura da cutícula do inseto [36].

224 Considerando a hipótese que os fungos *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado
 225 ESALQ E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03), proporcionaram baixa virulência sobre *H. armigera* devido
 226 à composição cuticular desta espécie é possível que os nutrientes que promovem a estruturação
 227 cuticular das lagartas tenham proporcionado uma barreira de proteção que impediu a penetração e
 228 posterior germinação dos conídios.

229 Entre os componentes que proporcionam a estruturação e fortalecimento da cutícula dos
 230 insetos, destaca-se a melanina, que interfere na penetração de patógenos, através de barreiras de

231 proteção física ou mecânica conferindo à cutícula importantes mecanismos de defesa contra
232 patógenos, devido às propriedades químicas que aumentam sua imunidade e atividade
233 antimicrobiana [42-46].

234 A baixa mortalidade apresentada neste estudo, contradiz os resultados de mortalidade obtidos
235 em testes de laboratório com isolados dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e
236 *Paecilomyces fumosoroseus* visando o controle de *H. armigera*, com variação de 68-100% de
237 mortalidade corrigida independente do estágio larval (L2-L5), [47]. Bioensaios utilizando *M. rileyi*
238 (1×10^7 conídios mL⁻¹) resultando em 90,5% de mortalidade de quarto instar de *H. armigera*
239 alimentadas com folhas de milho, soja, tomate e crisântemo tratados com este fungo [48].

240 Em relação à conidiogênese foram observados crescimento micelial de 100% das lagartas
241 mortas no tratamento com BOVERIL® (isolado ESALQ PL63), 10% para METARRIL® (isolado
242 ESALQ E9) e apenas dois cadáveres para *M. rileyi* (isolado UFMS 03). Os resultados de baixa
243 esporulação para *Metarhizium* corroboram com outros [47] que observaram menor porcentagem de
244 esporulação de *M. anisopliae* (isolado 79), (18,07%), em relação ao crescimento micelial de *B. bassiana*
245 (isolado 124), (67,19 %) e *P. fumosoroseus* (isolado 14) com (84,41%) sobre *H. armigera*.

246 Uma explicação alternativa é que em altas doses de fungos, numerosos esporos fúngicos
247 podem penetrar no hospedeiro simultaneamente causando a morte prematura do inseto, devido
248 fatores como a perda de água e, antes que o fungo possa explorar efetivamente os recursos
249 resultando em morte das larvas logo após a inoculação, não possibilitando a conidiogênese sobre o
250 cadáver [46].

251 A baixa suscetibilidade das lagartas de *H. armigera* aos fungos testados, não indica que esta
252 população está totalmente ilesa aos fungos entomopatogênicos, pois existe a possibilidade de
253 efeitos secundários associados aos estágios subsequentes. Estudos dos efeitos deletérios de *M.*
254 *anisopliae* (isolado M14) no condicionamento de *H. armigera* indicam que diferentes concentrações
255 sub-letais do fungo podem reduzir o crescimento populacional da F1 [48]. Efeitos indiretos sobre
256 populações de *H. armigera* também são relatados para aplicação de *B. bassiana* (isolado DC2)
257 proporcionando deformações dos adultos e ovos inférteis [14].

258 Sabe-se que mecanismo de infecção dos fungos entomopatogênicos é altamente especializado e
259 complexo, pois explora aspectos ainda não descritos por completo, como a relação inseto-fungo
260 [49]. Virulência de cada isolado [50] e a suscetibilidade do hospedeiro [51].

261 Diante da importância da *H. armigera* como praga agrícola e a biodiversidade de fungos
262 entomopatogênicos que o Brasil dispõe, novas investigações de virulência de cepas fúngicas são
263 necessárias para o incrementar o manejo integrado de lepidópteros-pragas através do controle
264 microbiano, potencial de novos isolados e principalmente o entendimento das relações entre os
265 microrganismos e os mecanismos de defesa dos hospedeiros.

266 5. Conclusões

267 Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolado ESALQ
268 E9) e *M. rileyi* (isolado UFMS 03) nas concentrações (1×10^7 , 1×10^8 , e 1×10^9 con.mL⁻¹) e métodos de
269 aplicação (DA ou DF) não foram virulentos às lagartas de primeiro, segundo, terceiro, quarto e
270 quinto instar de *H. armigera*. A mortalidade do tratamento com *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63) foi
271 confirmada pela conidiogênese sobre todos os cadáveres.

272 **Contribuições dos autores:** P.M.D. desenvolveu o projeto, montou e conduziu o experimento, coletou e
273 analisou os dados e escreveu o manuscrito. E.d.S.L. desenvolveu o projeto, supervisionou e auxiliou a
274 condução do experimento, forneceu fundos para a compra de materiais e revisou o manuscrito.

275 **Financiamento:** Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino de Ciência e Tecnologia do Estado de
276 Mato Grosso do Sul (FUNDECT), bolsa de doutorado número (59/300.513/2016).

277 **Agradecimentos:** Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de
278 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Agradecemos ao Programa de
279 Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB-UFGD), Dourados,

280 MS. Ao órgão de fomento Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino de Ciência e
 281 Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT). Ao Conselho Nacional de
 282 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
 283 (UFMS) em Chapadão do Sul, e os membros do grupo de pesquisa LAMIP.

284 **Conflito de interesses:** Os autores declaram que não há conflito de interesses.

285 Referências

- 286 1. Ávila, J.C.; Vivian, L.M.; Tomquelski, G.V. *Occurrence, Biological Aspects, Damage and Management*
 287 *Strategies of Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Agricultural Production Systems;*
 288 Embrapa Agropecuária Oeste: Dourados, Brazil, 2013; p. 12. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular
 289 Technique, 23).
- 290 2. Czepak, C.; Albernaz, K.C.; Vivian, L.M.; Guimarães, H.O.; Carvalhais, T. First record of occurrence of
 291 *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesqui. Agropecu. Trop.* **2013**, *43*, 110–113,
 292 doi:10.1023/S198340632013000100015.
- 293 3. Fathipour, Y.; Sedaratian, A. Integrated management systems of cultivation of soy *Helicoverpa armigerain*.
 294 In *Resistance a Pests of Soybeans*; Elshemy, H.A., Ed.; InTeOpP: Cairo, Egypt, 2013; pp. 231–280.
- 295 4. De Bueno, A.F.; Carvalho, G.A.; dos Santos, A.C.; Sosa-Gómez, D.R.; Silva, D.M.D. Pesticide selectivity to
 296 natural enemies: Challenges and constraints for research and field recommendation. *Ciência Rural* **2017**,
 297 *47*, 1–10.
- 298 5. Alves, S.B.; Lopes, R.B. *Microbial Control of Pests in Latin America*; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 2008; p. 414.
- 299 6. Shang, Y; Feng, P; Wang, C. Fungi That Infect Insects: Altering Host Behavior and Beyond. *PLoS Pathog*
 300 **2015**, *11*, 8. Available online: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005037> (accessed on: 23 April
 301 2019).
- 302 7. Holdom, D.G. Van De Klashorst, G. Sporulation by hyphal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent
 303 infection of *Heliothis* spp. *Journal of Invertebrate Pathology* **1986**, *48*, 242-245.
- 304 8. Hassani, M. Development and proving of biocontrol methods based on *Bacillus thuringiensis* and
 305 entomopathogenic fungi against the cotton pests *Spodoptera lituralis*. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:
 306 Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). PhD thesis. University of Giessen. Germany,
 307 2000. p 130.
- 308 9. Sandhu, S.S.; Unkles, S.E.; Rajak, R.C.; Kinghorn, J.R. Generation of Benomyl resistant *Beauveria bassiana*
 309 strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Science and Technology* **2001**, *11*, 245-250.
- 310 10. Sun, L.J.; Wu, K.M.; Guo, Y.Y. The pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Helicoverpa armigera* under
 311 different temperatures and humidities. *Acta Entomologica Sinica* **2001**, *44*, 501-506.
- 312 11. Tang, G.; Hou, R. Effects of environmental factors on the virulence of the entomopathogenic fungus
 313 *Nomuraea rileyi*, against the ear of corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep. Noctuidae). *J. Appl. Entomol.*
 314 **2001**, *125*, 243–248.
- 315 12. Devi, P.S.S.; Prasad, Y.F.; Chowdary, D.A.; Rao, L.M.; Balakrishnan, K. Identification of virulent isolates
 316 of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson is the management of *Helicoverpa armigera*
 317 and *Spodoptera litura*. *Mycopathologia* **2003**, *56*, 365–373.
- 318 13. Wang, C.; St Leger, R.J. The collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* a evade insect
 319 immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6647–6652.
- 320 14. Kalvnadi, E.; Mirmoayedi, A.; Alizadeh, M.; Pourian, H.R. Sublethal concentrations of the
 321 entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, increase the costs of physical conditioning of pupae of
 322 *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, *158*, 32–42.
- 323 15. Khan S.; Guo, L.; Maimaiti, Y.; Mijit, M.; Qiu, D. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent.
 324 *Mol Plant Breed* **2012**, *3*, 63–79.
- 325 16. Costa, V.H.D.; Soares, A.M.; Rodriguez, F.A.D.; Zanoncio, J.C.; Silva, I.M.; Valicente, F.H. *Nomuraea rileyi*
 326 (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. *Flo.*
 327 *Entomol.* **2015**, *980*, 796–798.
- 328 17. Dias, P.M.; Werner, A. M.; Loureiro, E. de S.; Pessoa, L. G.; Tosta, R. A. de S. Enzootia de *Metarhizium*
 329 *rileyi* em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja. I Semana de Estudos Acadêmicos do
 330 CPCS- 17 a 19 de Outubro de 2018- UFMS- Chapadão do Sul / MS, Brasil, p. 33.

- 331 18. Dias, P.M.; Loureiro, E.S.L.; Pessoa, L.G.A.; Mateus, M.P.B.; Tosta, R.A.S.; Oliveira Neto, F.M.; Devoz,
332 G.L.R. Epizootia De *Metarhizium rileyi* em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivo de
333 soja. 71ª Reunião Anual da SBPC - 21 a 27 de julho de 2019 - UFMS - Campo Grande / MS.
- 334 19. Dias, P.M.; Almeida Filho, L.M.; Pessoa, L.G.A.; Loureiro, E.S.; Ramalho, K.F. Production of *Metarhizium*
335 *rileyi* in Different Mixtures of Rice and Sorghum. XII Agronomic Week Cassilândia & V week of Research
336 of the Post-graduation. In Proceedings of the V Week of Postgraduate Research, Cassilândia, Brazil, 21
337 March 2017; p. 99.
- 338 20. Loureiro, E.S.; Pessoa, L.G.A.; Dias, P.M.; Ribeiro, M.P.; Tosta, R.A.S.; Teodoro, P.E. Hydration levels on
339 conidial production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycota) in solid growing medium. *Rev. de Agricul. Neotrop.*
340 **2019**, *6*, 19-23.
- 341 21. Pell, J.K.; Eilenberg, J.; Hajek, A.E.; Steinkraus, D.C. Biology, ecology and pest management potential of
342 *Entomophthorales*. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and*
343 *potential*. CABI, Wallingford, 2001, pp 71–153.
- 344 22. Vega, F.E. the use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review, *Mycologia*,
345 **2018**, *110*, 4-30, doi:10.1080/00275514.2017.1418578_
- 346 23. Mora, M.A.E.; Castilho, A.M.C.; Fraga, M.E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic
347 fungi. *Arq. Inst. Biol.* **2017**, *84*, 1-10, doi: 10.1016/0022-2011(82)90153-7.
- 348 24. Dias, P.M.; Loureiro, E.S.L.; Pessoa, L.G.A.; Oliveira Neto, F.M.; Tosta, R.A.S.; Teodoro, P.E. Interactions
349 between Fungal-Infected *Helicoverpa armigera* and the Predator *Chrysoperla externa*. *Insects* **2019**, *10*, 1-11.
350 doi:10.3390/insects10100309.
- 351 25. Greene, G.L.; Leppla, N.C.; Dickerson, W.A. Velvet bean caterpillar: The rearing procedure artificial
352 medium. *J. Econ. Entomol.* **1976**, *69*, 487–488.
- 353 26. Pinóia, S.F. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) and Spinosad in Combating the *Helicoverpa armigera*
354 (crystalline) (Lepidoptera: Noctuidae) in Amaa. Master's Thesis (Masters in Agronomic Engineering),
355 Intitua Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2012; p. 89. (In
356 Portuguese).
- 357 27. Rodríguez, H.C.; Vendramim, J.D. Use of nutritional indices a measure el efeca insectistatico extracts of
358 meliaceae on *Spodoptera frugiperda*. *Man. Int. Plagas* **1998**, *48*, 11–18.
- 359 28. Rossoni, C.; Kassab, S.O.; Loureiro, E.S.; Pereira, F.; Costa, D.P.; Barbosa, R.H.; Zanuncio, J.C. *Metarhizium*
360 *anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes*
361 (Hymenoptera: Braconidae). *Fla. Entomol.* **2014**, *97*, 1794–1804.
- 362 29. Thungrabeab, M.; Angma, S. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (BALSAM) and
363 *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non-target insects. *KMITL Sci. Technol. J.* **2007**, *7*, 1.
- 364 30. Hassan, S.A. Standard methods a test the Sideeffects of pesticides on natural enemies of insects and mites
365 developed by the IOBC/WPRS Wprk Group 'Pesticides and Beneficial Organisms". *EPPO Bull.* **1985**, *15*,
366 214–255.
- 367 31. Hassan, S.A. Standardized techniques for testing side-effects of pesticides on beneficial arthropods in the
368 laboratory. *ZeitschriftUr Pflanz. Flanzenschutz* **1977**, *84*, 158–163.
- 369 32. Cardoso, E.R.; Freitas, S.; Nunes, H.T.; Pessoa, L.G.A. Selectivity of *Lecanicillium lecanii* and *Metarhizium*
370 *anisopliae* for first instar larvae of *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory. *Acta Sci.*
371 *Agron.* **2007**, *29*, 563–568.
- 372 33. Bhering, L.L. Rbio: A Tool for Biometric and Statistical Analysis Using the R Platform. *Crop Breed. Appl.*
373 *Biotechnol.* **2017**, *17*, 187–190.
- 374 34. Gupta, S., Krasnoff, S. B., Roberts, D.W., Renwick, J.A.A., Brinen, L. S, Clardy, J. Structure of efrapeptins
375 from the fungus *Tolypocladium niveum*: peptide inhibitors of mitochondrial ATPase. *J. Org. Chem.* **1992**,
376 *57*, 2306-2313, doi:10.1021/jo00034a022. (Accessed on: 07 Julhy 2019).
- 377 35. Leal, S.C.M., Bertoli, D.J., Butt, T.M., Carter, J.H., Burrows, P.R., Peberdy, J.F. Amplification and
378 restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium*
379 *anisopliae*. *Mycological Research* **1997**, *101*, 257-265.
- 380 36. Hajek AE; Eastburn CC. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and
381 non-host larval cuticle. *J Invertebr Pathol.* **2003**, *82*, 12-22, doi:10.1016/s0022-2011(02)00198-2.
- 382 37. Wang, C.; Feng, M.G. Advances in fundamental and applied studies in china of fungal biocontrol agents
383 for use against arthropod pests. *Biol Control* **2014**, *68*, 129-135.

- 384 38. Ruiz, A.C. Virulência de *Nomuraea rileyi* à *Spodoptera frugiperda* e perfil protéico do secretoma em presença
385 da cutícula do inseto. (Dissertação) Mestrado Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande
386 do Sul, 38 p., 2016. (In Portuguese).
- 387 39. Alves, S.B.; Milk, L.H.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Marques, E.J. Massal production of
388 entomopathogenic fungi in Latin America. In *Microbial Control of Pests in Latin America*, 2nd ed.; Alves,
389 S.B., Lopes, R.B., Eds.; FEALQ: Peicaba, Brazil, 2008; pp. 215–237.
- 390 40. ST Leger, R.J.; Wang, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect
391 pests. *Appl. Microb. and Biotec.* **2010**, *85*, 901-907.
- 392 41. Bianco, L., Perrota, G. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from
393 sample preparation to secretoma analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, **2015**, *16*, 5803-5820.
- 394 42. Ourth, D.D.; Renis, H.E. Antiviral melanization reaction of *Heliothis virescens* against DNA and RNA
395 viruses in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* **1993**, *105*, 719-723.
- 396 43. Sidibe, S., Saal, F., RhodesFeuillette, A., Lagaye, S., Pelicano, L., Canivet, M., Peries, J. & Dianoux, L.
397 (1996). Effects of serotonin and melanin on in vitro HIV-1 infection. *J. Biol. Regulators Homeostatic Agents*,
398 **1996**, *10*, 19-24.
- 399 44. Owens, I.P.F.; Wilson, K. Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring?
400 *Trends Ecol. Evol.* **1999**, *14*, 170-172.
- 401 45. Ishikawa, H.; Mitsui, Y.; Yoshitomi, T.; Mashimo, K.; Aoki, S.; Mukuno, K.; Shimizu, K. Presynaptic
402 effects of botulinum toxin type A on the neutrally evoked response of albino and pigmented rabbit iris
403 sphincter and dilator muscles. *Jap. J. Ophthalmol.* **2000**, *44*, 106-109.
- 404 46. Wilson, K.; Cotter, S.C.; Reeson, A.F.; Pell, J.K. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*
405 **2001**, *4*, 637–649, doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00279.x.
- 406 47. Nguyen T. H.; Borgemeister, C.; Poehling, H-M.; Zimmermann, G. Laboratory investigations on the
407 potential of entomopathogenicfungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae
408 and pupae, *Biocon. Scien and Technol.* **2007**, *17*, 853-864, doi:10.1080/09583150701546375.
- 409 48. Tang, L.; Hou, R.F. Potential application of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, for control of
410 the corn earworm, *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Experimen. et Appl.* **1998**, *88*, 25-30.
- 411 49. Jarrahi A.; Safavi, S.A. Fitness costs to *Helicoverpa armigera* after exposure to sub-lethal concentrations of
412 *Metarhizium anisopliae* Ssensu Lato: study on F1 generation. *J Invertebr Pathol.* **2016**, *138*, 50–56.
- 413 50. Vestergaard, S.; Gillespie, A.T.; Butt, T.M.; Schreiter, G.; Eilenberg, J. Pathogenicity of the Hyphomycete
414 fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Frankliniella occidentalis*.
415 *Biocontrol Science and Technology*, **1995**, *5*, 185-192.
- 416 51. Safavi. S.A., Shah. F.A., Pakdel. A.K., Rasouljan. G.R.; Bandani. A.R., Butt. T.M. Effect of nutrition on
417 growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *270*,
418 116–123. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x.

Capítulo II ³
**Virulence of Entomopathogenic Fungi on Larvae of *Chrysoperla externa* (Neuroptera:
Chrysopidae)**

³ Este artigo segue as normas da Revista Insects.

1 Article

2 Virulence of Entomopathogenic Fungi on Larvae of 3 *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

4 Pamella Mingotti Dias ^{1,*}, Elisângela de Souza Loureiro ^{1,2},

5 ¹ Graduate Program in Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal of the Grande
6 Dourados, Dourados, MS, 79.804-970, Brasil.

7 ² Agronomy, Federal University of Mato Grosso of the Sul, Chapadão do Sul, MS, 79.560-000, Brazil.

8 *Correspondence: pamellamingotti@hotmail.com

9 Received: date; Accepted: date; Published: date

10 **Abstract:** Assuming the selective action of entomopathogenic fungi in relation to green lacewings,
11 in this study we evaluated the virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (ESALQ
12 PL63), *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9) and *M. rileyi* (UFMS 03) on the mortality and duration of
13 the first-, second-, and third-instar larvae of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). For
14 this purpose, different experimental treatments were tested: control, distilled water and 0,01%
15 Tween80®; and *B. bassiana*, *M. anisopliae*, and *M. rileyi* on the concentrations of 1×10^7 , 1×10^8 and
16 1×10^9 conidia mL⁻¹. The treatments were applied with a Potter spray tower using two distinct
17 methodologies: direct application and dry film. There was no mortality for first, second and third
18 instar larvae of *C. externa* treated with *M. anisopliae* and *M. rileyi*. However, low mortality of *B.*
19 *bassiana* on these three larval instars was showed at 120 HAA. The percentage of individuals
20 which revealed changes in the larval instar and the duration of the pupal period varied among the
21 different entomopathogenic fungi and control treatment, application methodology and
22 concentrations. Mycelial growth was observed in all dead bodies of larvae infected with *B. bassiana*
23 and in two dead bodies with *M. anisopliae*. Despite *B. bassiana* has revealed higher virulence than
24 *M. anisopliae* and *M. rileyi* on larvae of *C. externa*, these three entomopathogenic fungi may be used
25 in association with *C. externa* for integrated pest management in cropping systems.

26 **Keywords:** Hypocreales; entomopathogens; microbial control; entomophagous; predator; green
27 lacewing; integrated pest management; sustainability

28 1. Introduction

29 The Neotropical fauna of green lacewings presents high diversity, with 82 genera [1]. The
30 species *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) is commonly found in Brazil,
31 with reports of the occurrence in different regions [2]. Studies have proven the effectiveness of this
32 predatory species in the biological control of pests in the cultivation of cotton, wheat, sorghum,
33 citrus, peach, and melon [3-8].

34 Among the entomopathogens, the entomopathogenic fungi are in the biological control of
35 arthropod pests through natural epizootics [9]. In the system of integrated pest management (IPM),
36 the fungi belonging to the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Isaria* are the most widely used in
37 applied biological control of various arthropod pests [10-11]. The agricultural production systems
38 have adopted the IPM as a model of success in agriculture; however, the chemical control is still a
39 priority, and this is due to the idea of lower production cost and mainly to the lack of suitable
40 information about the association of management tools that fit the applicability in production field
41 [12].

42 The use of pesticides incorrectly and excessive has provided the reduction of natural enemies,
43 selection of resistant populations, and resurgence of pests [13-15]. The phytosanitary products
44 selective may intervene in the development and survival of entomophagous and entomopathogens
45 [16.14]. There are reports of negative interference of pesticides on all stages of development of *C.*
46 *externa* [17-21].

47 The selectivity of the entomopathogenic fungi concerning green lacewings raises the potential
48 of biological control by the synergism and conservation of natural enemies in the agroecosystem.
49 Studies carried out in Brazil indicate selectivity of entomopathogenic fungi on the species of green
50 lacewings, *C. externa*, and *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) [22-26].

51 Assuming the selective action of entomopathogenic fungi in relation to chrysopidae, this study
52 aimed to evaluate the selectivity of entomopathogenic fungi *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M.*
53 *anisopliae* (isolado ESALQ E9) and *M. rileyi* (isolado UFMS 03) on the larval stage of *C. externa*.

54 2. Materials and Methods

55 The fungi *Beauveria bassiana* (isolado ESALQ PL63) and *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ
56 E9) were obtained from commercial formulated BOVERIL® and METARRIL®, respectively. The
57 *Metarhizium rileyi* (isolado UFMS 03) was derived from the database of entomology laboratory of
58 the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus of Chapadão do Sul, MS, Brazil. The
59 isolado UFMS 03 was produced following the standard methodology [27].

60 1.1. Obtaining and rearing *Chrysoperla externa*

61 Adults of *C. externa* from collections in maize crop and grasses in the experimental area of the
62 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, Brazil were identified [28] and kept
63 in a climatized room at temperature of 25±1 °C, relative humidity (RH) 70±10% and photoperiod of
64 12 hours (light: dark=L:D).

65 The handling of postures and rearing of adults and larvae of *C. externa* were performed with a
66 standard methodology [29]. As a nutrition source was provided, an artificial diet composed of yeast
67 of beer and honey (v/v) for adults and eggs of *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)
68 for larvae [30-31].

69 2.3 Selectivity of the entomopathogenic fungi to *Chrysoperla externa* larvae

70 Under controlled conditions with temperature of 25±1 °C, (RH) 70±10% and photoperiod of 12
71 hours (L:D), larvae of first, second and third instar of *C. externa* were individualized in Petri plates®
72 (Figure S1 A, B, C) and then applied with the help of Potter's tower adjusted with pressure 1.5 MPa,
73 2 mL of treatments: T1: control (sterile distilled water + 0,001% (v/v) Tween 80®); T2: *B. bassiana*
74 (isolate ESALQ PL63); T3: *M. anisopliae* (isolate ESALQ E9); T4: *N. rileyi* (isolado UFMS 03) in
75 concentrations: (1×10⁷, 1×10⁸ and 1×10⁹ conidia mL⁻¹ = con.mL⁻¹). In all fungal suspensions were
76 added 0,001% (v/v) of Tween 80® (Figure S1 (D)). Two methodologies were used: direct application
77 (DA) of treatments on the larvae of first, second, third instar, and artificial diet (eggs of *A. kuehniella*
78 sterilized and inside of Petri dishes® called arenas [32] (Figure S1 (E)). In the methodology of dry
79 film (DF), the treatments were applied on the arenas, with insertion of larvae and artificial diet after
80 drying the excess moisture (Figure S1 (F)), according to the model proposed by the International

81 Organization for Biological and Integrated Control of Harmful Animals and Plants, Western
82 Palaearctic Regional Section (IOB/WPRS) [33-34].

83 After the applications and its drying, the Petri dishes® were sealed with plastic film and then
84 closed with their lids of glass to avoid leakage of larvae and wrapped within the biological oxygen
85 demand (B.O.D) chamber under the following conditions: temperature 25 ± 1 °C, (RH) $70\pm 10\%$ and
86 photoperiod of 12 hours (L:D). Larvae received an artificial diet (eggs of *A. kuehniella*) following the
87 nutritional needs of each instar [35].

88 The larval mortality and the duration of each larval stage during 24, 48, 72, 96, and 120 hours
89 after application (HAA) was determined. For confirmation of larval mortality, the methodology of
90 surface disinfection of larvae and preparation of a humid chamber was used as described by [24].

91 For the third instar larvae that survived to the treatments, the ratings were extended up to 168
92 hours (HAA) with the counting of individuals who have reached the stage of pre-pupae and pupae
93 and duration of these periods. The pupal viability was evaluated by the emergence of adults.

94 The viability of adults was recorded until 24 hours after the emergency, whereas viable insects
95 that had regular morphological specifications: antennas whole, compound eyes, abdomen full, total
96 opening of the wings, and size of insects between (20-23 mm). This visual scale was adopted before
97 the information available in the literature [36] and of deformities observed in other bioassays.

98 2.4 Statistical Analysis

99 A completely randomized experimental design was used considering a $4 \times 3 \times 2 + 1$ factorial
100 arrangement with 30 replicates for each larval age (first, second and third instar), i.e. four
101 treatments (P= Products), three concentrations (C= concentrations (1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9 con mL^{-1})),
102 two application methods (A= Application (direct application (DA) and dry film (DF)) and a control
103 treatment. Bioassay of entomopathogenic fungi selectivity to larvae of *C. externa* was performed in
104 three replicates.

105 The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and means compared by Tukey test
106 at 5% probability level using the software Rbio [37].

107 3. Results

108 3.1. Mortality and duration of the first instar of *Chrysoperla externa*

109 First instar larvae of *C. externa* have a higher susceptibility to the product (P) *B. bassiana* at 120
110 (HAA), differing significantly from the other treatments (control, *M. anisopliae* and *M. rileyi*) ($p <$
111 0.05 ; Table 1). The application methods (A), the concentrations (C) and the interactions (P×A, P×C,
112 A×C, and P×A×C) did not significantly affect the survival of first instar larvae of 24 to 120 (HAA) (p
113 > 0.05 ; Table 1).

114 The average mortality (0.03) recorded for the first instar larvae of *C. externa* 24 to 96 (HAA) did
115 not differ significantly between the independent factors (P, A and C) and in interactions (P×A, P×C,
116 A×C, and P×A×C). At 120 (HAA), the larvae treated with *B. bassiana* isolates showed higher mean
117 mortality (0.26) differing significantly among the products (P) (Table 2).

118

119

120 **Table 1.** ANOVA of the mortality of first instar larvae of *Chrysoperla externa* after application of
 121 entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C,
 122 RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D))

SV	DF	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Product (P)	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	1.40*
Application (A)	1	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.08 ns
Concentration (C)	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.21 ns
PxA	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.03 ns
PxC	9	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.02 ns
AxC	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns
PxAxC	9	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.01 ns
Residue	580	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01

123 *Significance at 5% probability level by F-test; ns: not-significance at 5% probability by F-test. SV: source of
 124 variation; DF: degrees of freedom; Numbers are F-values.

125 **Table 2.** Means (mean ± standard error) of mortality of *Chrysoperla externa* larvae after application of
 126 the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ±
 127 1 °C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D)).

Product (P)	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Control	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b
<i>B. bassiana</i>	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.26 ± 0.03 a
<i>M. anisopliae</i>	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.12 ± 0.02 b
<i>M. rileyi</i>	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.07 ± 0.01 b
Application (A)					
Direct (DA)	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.15 ± 0.01 a
Dry film (DF)	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.13 ± 0.01 a
Concentration (C)					
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.19 ± 0.01 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.15 ± 0.01 a
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.10 ± 0.01 a

128 For each factor, mean followed by the same letter in the columns do not differ statistically by Tukey
 129 test at 5% probability.

130 The duration of the first instar of *C. externa* ranged regardless of the treatments applied (P),
 131 with significant differences from 48 to 120 (HAA) ($p < 0.05$; Table 3). The application methods (A)
 132 did not differ significantly between the periods evaluated, so the methods of exposure did not
 133 influence the duration of first instar larvae of green lacewings. The concentration (C) of treatments
 134 showed significant differences only with 120 (HAA). The interactions do not differ significantly ($p >$
 135 0.05; Table 3).

136
 137
 138

139 **Table 3.** ANOVA of the duration of first instar larvae of *Chrysoperla externa* after application of the
 140 entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1
 141 °C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D))

SV	DF	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Product (P)	3	0.00 ^{ns}	6.59*	4.35*	1.27*	1.65*
Application (A)	1	0.00 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.20 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.00 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.48*
PxA	3	0.00 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.24 ^{ns}
PxC	9	0.00 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.46 ^{ns}	0.28 ^{ns}	0.11 ^{ns}
AxC	3	0.00 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.15 ^{ns}
PxAxC	9	0.00 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.06 ^{ns}
Residue	580	0.03	0.12	0.17	0.21	0.12

142 *Significance at 5% probability level by F-test; ns: not-significance at 5% probability by F-test. SV:
 143 source of variation; DF: degrees of freedom; Numbers are F-values.

144 The larvae of *C. externa* presented a change in larval stage between 48 and 120 (HAA), with
 145 significant differences only between the factor (P) ($p < 0.05$; Table 4).

146 **Table 4.** Means (mean ± standard error) for the duration of first instar larvae of *Chrysoperla externa*
 147 after application of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and
 148 *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D)).

Product (P)	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Control	0.03 ± 0.00 a	0.73 ± 0.05 a	0.13 ± 0.04 c	0.16 ± 0.04 b	0.03 ± 0.00 c
<i>B. bassiana</i>	0.03 ± 0.00 a	0.12 ± 0.02 b	0.13 ± 0.02 c	0.43 ± 0.03 a	0.17 ± 0.02 ab
<i>M. anisopliae</i>	0.03 ± 0.00 a	0.10 ± 0.00 b	0.31 ± 0.00 b	0.28 ± 0.00 ab	0.28 ± 0.00 a
<i>M. rileyi</i>	0.03 ± 0.00 a	0.18 ± 0.00 b	0.48 ± 0.00 a	0.32 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 bc
Application (A)					
Direct (DA)	0.03 ± 0.00 a	0.21 ± 0.02 a	0.29 ± 0.02 a	0.31 ± 0.02 a	0.14 ± 0.01 a
Dry film (DF)	0.03 ± 0.00 a	0.18 ± 0.02 a	0.28 ± 0.02 a	0.34 ± 0.02 a	0.18 ± 0.02 a
Concentration (C)					
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.02 a	0.11 ± 0.03 a	0.31 ± 0.03 a	0.29 ± 0.03 a	0.21 ± 0.02 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.15 ± 0.02 a	0.34 ± 0.03 a	0.36 ± 0.03 a	0.10 ± 0.01 b
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.14 ± 0.02 a	0.26 ± 0.03 a	0.38 ± 0.03 a	0.21 ± 0.02 a

149 For each factor, mean followed by the same letter in the columns do not differ statistically by Tukey
 150 test at 5% probability.

151 At 48 (HAA), all of the entomopathogenic fungi have reduced the duration of first instar larvae
 152 concerning control. At 72 (HAA), the larvae infected with the fungus *M. rileyi* showed the higher
 153 mean duration of first instar (0.48) concerning the other treatments, followed by treatment with *M.*
 154 *anisopliae* (0.31), both with significant differences concerning the control and *B. bassiana* (0.13). At 96
 155 (HAA), the larvae of the control treatment presented lower of larval duration (0.16) concerning *B.*
 156 *bassiana* (0.43) and *M. rileyi* (0.32). At 120 (HAA), the larvae treated with *B. bassiana* (0.28) and *M.*

157 *anisopliae* (0.17) differed significantly concerning the control (0.03) for the duration of first instar ($p <$
158 0.05; Table 4).

159 3.2. Mortality and duration of the second instar of *Chrysoperla externa*

160 The mortality of second instar larvae of *C. externa* was observed only at 120 (HAA) with
161 significant differences between the factor (P) ($p < 0.05$; Table 5). The factors (A), (C) and the
162 interactions (P×A, P×C, A×C, or P×A×C) did not significantly affect the survival of larval stage ($p >$
163 0.05; Table 5).

164 **Table 5.** ANOVA of the mortality of second instar larvae of *Chrysoperla externa* after application of
165 entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C,
166 RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D))

SV	DF	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Product (P)	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.80*
Application (A)	1	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.01 ns
Concentration (C)	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.01 ns
PxA	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns
PxC	9	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.01 ns
AxC	3	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.01 ns
PxAxC	9	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.06 ns
Residue	580	0.03	0.03	0.03	0.03	0.07

167 * Significance at 5% probability level by F-test; ns: not-significance at 5% probability by F-test. SV:
168 source of variation; DF: degrees of freedom; Numbers are F-values.

169 The treatment with *B. bassiana* provided greater mortality (0.17) of second instar larvae at 120
170 (HAA), differing significantly from the control (0.03), *M. anisopliae* (0.05), and *M. rileyi* (0.03) (Table
171 6).

172 **Table 6.** Means (mean ± standard error) for mortality of second instar larvae of *Chrysoperla externa*
173 after application of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and
174 *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1°C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D)).

Product (P)	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Control	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b
<i>B. bassiana</i>	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.17 ± 0.02 a
<i>M. anisopliae</i>	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 b
<i>M. rileyi</i>	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b
Application (A)					
Direct (DA)	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.08 ± 0.01 a
Dry film (DF)	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.07 ± 0.01 a
Concentration (C)					
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.10 ± 0.01 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.07 ± 0.01 a
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.08 ± 0.01 a

175 For each factor, mean followed by the same letter in the columns do not differ statistically by Tukey
176 test at 5% probability level.

177 About the duration of the second instar was observed variations in exchange for the larval
 178 stage at 72 and 96 (HAA), with significant differences only for the product (P) ($p < 0.05$; Table 7). In
 179 all periods evaluated the factors (A and C) and the interactions (P×A, P×C, A×C, or P×A×C) were
 180 not significant ($p > 0.05$; Table 7).

181 **Table 7.** ANOVA of the duration of second instar larvae of *Chrysoperla externa* after application of
 182 the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ±
 183 1 °C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D)).

SV	GL	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Product (P)	3	0.00 ^{ns}	0.26 ^{ns}	0.71*	0.63*	0.00 ^{ns}
Application (A)	1	0.00 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.00 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.00 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.00 ^{ns}
P×A	3	0.00 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.39 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.00 ^{ns}
P×C	9	0.00 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.00 ^{ns}
A×C	3	0.00 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.00 ^{ns}
P×A×C	9	0.00 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.00 ^{ns}
Residue	580	0.03	0.14	0.23	0.23	0.03

184 * Significance at 5% probability level by F-test; ns not-significance at 5% probability level by F-test.
 185 SV: source of variation; DF: degrees of freedom; Numbers are F-values.

186 About the duration of the second instar, the exchange for the subsequent larval stage were
 187 higher at 72 and 96 (HAA), where the larvae treated with *B. bassiana* presented a lower duration
 188 concerning the control treatment. At 96 (HAA) were observed greater duration of the larval period
 189 of the second instar concerning control when this stage was treated with *M. rileyi* (Table 8).

190 **Table 8.** Means (mean ± standard error) for the duration of second instar larvae of *Chrysoperla*
 191 *externa* after application of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and
 192 *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1 °C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D)).

Product (P)	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Control	0.03 ± 0.00 a	0.28 ± 0.05 a	0.48 ± 0.06 a	0.23 ± 0.05 b	0.03 ± 0.00 a
<i>B. bassiana</i>	0.03 ± 0.00 a	0.15 ± 0.03 a	0.30 ± 0.03 b	0.39 ± 0.03 ab	0.03 ± 0.00 a
<i>M. anisopliae</i>	0.03 ± 0.00 a	0.16 ± 0.02 a	0.43 ± 0.03 ab	0.38 ± 0.03 ab	0.03 ± 0.00 a
<i>M. rileyi</i>	0.03 ± 0.00 a	0.17 ± 0.02 a	0.37 ± 0.03 ab	0.43 ± 0.03 a	0.03 ± 0.00 a
Application (A)					
Direct (DA)	0.03 ± 0.02 a	0.18 ± 0.02 a	0.38 ± 0.02 a	0.38 ± 0.02 a	0.03 ± 0.00 a
Dry film (DF)	0.03 ± 0.00 a	0.17 ± 0.02 a	0.38 ± 0.02 a	0.39 ± 0.02 a	0.03 ± 0.00 a
Concentration (C)					
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.15 ± 0.02 a	0.41 ± 0.03 a	0.35 ± 0.03 a	0.03 ± 0.00 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.19 ± 0.02 a	0.33 ± 0.03 a	0.43 ± 0.03 a	0.03 ± 0.00 a
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.03 ± 0.00 a	0.15 ± 0.02 a	0.36 ± 0.03 a	0.43 ± 0.03 a	0.03 ± 0.00 a

193 For each factor, mean followed by the same letter in the columns do not differ statistically by Tukey
 194 test at 5% probability level.

195 3.3. Mortality and duration of the third instar of *Chrysoperla externa*

196 Third instar larvae of *C. externa* presented mortality at 120 (HAA), with a significant difference
 197 between the products (P) ($p < 0.05$; Table 9). The application methods (A) concentrations (C) and the
 198 interactions (P×A, P×C, A×C, or P×A×C) did not significantly affect the survival of third instar
 199 larvae of *C. externa* ($p > 0.05$; Table 9).

200 **Table 9.** ANOVA of the mortality of third instar larvae of *Chrysoperla externa* after application of
 201 entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1
 202 °C, RH of $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 12 hours (L:D)).

SV		24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Product (P)	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.15*
Application (A)	1	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.41 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.46 ^{ns}
PxA	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.01 ^{ns}
PxC	9	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.03 ^{ns}
AxC	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}
PxAxC	9	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.18 ^{ns}
Residue	580	0.03	0.03	0.03	0.03	0.05

203 *Significance at 5% probability by F-test; ns not-significance at 5% probability by F-test. SV: source
 204 of variation; DF: degrees of freedom; Numbers are F-values.

205 The treatment with *B. bassiana* provided higher mortality (0.10) for the third instar larvae of *C.*
 206 *externa* concerning treatments with other fungal suspensions and control. The other factors did not
 207 influence the increase of mortality (Table 10).

208 **Table 10.** Means (mean \pm standard error) of the mortality third larvae of *Chrysoperla externa* after
 209 application of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium*
 210 *rileyi* (T: 25 ± 1 °C, RH of $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 12 hours (L:D)).

Product (P)	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours
Control	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 b
<i>B. bassiana</i>	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.10 \pm 0.00 a
<i>M. anisopliae</i>	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.05 \pm 0.00 b
<i>M. rileyi</i>	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 b
Application (A)					
Direct (D.A.)	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.06 \pm 0.00 a
Dry film (D.O.)	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.05 \pm 0.00 a
Concentration (C)					
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.05 \pm 0.00 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.00 a
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.00 a	0.04 \pm 0.00 a

211 For each factor, mean followed by the same letter in the columns do not differ statistically by Tukey
 212 test at 5% probability level.

213 The third instar larvae that survived to the treatments began the process of changes to the pre-
214 pupae from 72 (HAA), and all the larvae reached this stage at 120 (HAA), with significant
215 differences (P) (A) and (C) tested ($p < 0.05$; Table 11).

216 Postoperative changes to the pre-pupal stage, all insects showed power outage and formation
217 of cocoons, the process lasted between 148 and 164 (HAA), with significant differences only
218 concerning products (P) ($p < 0.05$; Table 11). The factors (P), (A), (C) or in interactions (P×A, P×C,
219 A×C, or P×A×C) did not differ significantly to the pupal stage ($p > 0.05$; Table 11).

220 Individual analysis for each evaluation time noticed that the larvae of the control treatment
221 began the process of change from 72 (HAA), with a higher average concerning the others (P). In this
222 period were also observed variations for the factor (A), with a higher average for (DA) in relation
223 (DF). The concentration (C) (1×10^9 con.mL⁻¹) showed lower average in relation to the concentration
224 (1×10^7 con.mL⁻¹) (Table 12).

225 At 96 (HAA), the larvae treated with *M. anisopliae* and *M. rileyi* presented lower averages for
226 the process of pre-pupae concerning control larvae; the concentration (C) (1×10^9 con.mL⁻¹) showed
227 mean variation in larval period lower than the other treatments (Table 12). At 120 (HAA), all insects
228 have concluded the phase of pre-pupae, and the control treatment presented a lower mean
229 concerning the entomopathogenic fungi; the concentration (C) (1×10^9 con.mL⁻¹) showed higher
230 mean concerning the other concentrations (Table 12).

231 In the period from 148 to 164 (HAA), all chrysochids reached the pupal stage; in this period
232 were recorded a higher duration for larvae treated with *B. bassiana* concerning *M. anisopliae* and *M.*
233 *rileyi*. The pupae do not display variations of duration (days) (Table 12). The pupae showed 100% of
234 viability from the emergence of adults. The adults showed no visual morphological deformities,
235 where all presented whole antennas, compound eyes, full abdomen, and size between 21-23 mm
236 (Figure S2 A, B, C).

237 3.4. Confirmed mortality

238 Conidiogenesis was observed in larvae treated with *B. bassiana* (all corpses) (Figure S3 A, B, C)
239 and *M. anisopliae* (dead bodies 2). There was no growth of entomopathogens applied nor of
240 opportunistic fungi on the corpses of the control treatment and *M. rileyi*.

241

242
243**Table 11.** ANOVA for the duration of third instar larvae of *Chrysoperla externa* after application of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1 °C, RH of 70 ± 10% and photoperiod of 12 hours (L:D)).

SV	DF	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours	148 hours	164 hours	Pupae
Product (P)	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	1.21*	2.97*	4.12*	4.98*	4.12*	3.44 ^{ns}
Application (A)	1	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.32*	0.02 ^{ns}	1.50 ^{ns}	2.40 ^{ns}	1.50 ^{ns}	0,54 ^{ns}
Concentration (C)	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.72*	3.68*	1.54*	1.26 ^{ns}	0.87 ^{ns}	0.75 ^{ns}
PxA	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.00 ^{ns}	1.07 ^{ns}	1.36 ^{ns}	1.07 ^{ns}	0.28 ^{ns}
PxC	9	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.12 ^{ns}	1.07 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.57 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.52 ^{ns}
AxC	3	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.12 ^{ns}	1.43 ^{ns}	1.34 ^{ns}	1.43 ^{ns}	1.27 ^{ns}
PxAxC	9	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.42 ^{ns}	0.28 ^{ns}	0.42 ^{ns}	0.87 ^{ns}
Residue	580	0.03	0.03	0.07	0.20	0.64	0.65	0.64	1.68

244
245

*Significance at 5% probability level by F-test; ns: not-significance at 5% probability level by F-test. SV: source of variation; DF: degrees of freedom; Numbers are F-values.

246

247 **Table 12.** Means (mean \pm standard error) of the duration of third instar larvae and pupae of *Chrysoperla externa* after application of the entomopathogenic fungi *Beauveria*
 248 *bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* (T: 25 ± 1 °C, RH of $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 12 hours (L:D)).

Product (P)	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	120 hours	148 hours	164 hours	Pupae
Control	0.03 \pm 0.00 a	0.28 \pm 0.00 a	0.27 \pm 0.05 a	0.73 \pm 0, 00 a	0.11 \pm 0.03 b	1.50 \pm 0.11 ab	0.50 \pm 0.11 ab	8.33 \pm 0.07 a
<i>B. bassiana</i>	0.03 \pm 0.00 a	0.15 \pm 0.00 a	0.13 \pm 0.02 b	0.53 \pm 0.03 ab	0.32 \pm 0.03 a	1.32 \pm 0.07 b	0.63 \pm 0.06 a	8.75 \pm 0.12 a
<i>M. anisopliae</i>	0.03 \pm 0.00 a	0.16 \pm 0, 00 a	0.12 \pm 0.02 b	0.35 \pm 0.03 b	0.37 \pm 0.03 a	1.65 \pm 0.05 a	0.32 \pm 0.05 b	8.51 \pm 0.01 a
<i>M. rileyi</i>	0.03 \pm 0.00 a	0.17 \pm 0.00 a	0.00 \pm 0.00 b	0.36 \pm 0.03 b	0.32 \pm 0.03 a	1.68 \pm 0.05 a	0.31 \pm 0.05 b	8.51 \pm 0.05 a
Application (A)								
Direct (DA)	0.03 \pm 0.00 a	0.18 \pm 0.00 a	0.12 \pm 0.01 a	0.45 \pm 0.02 a	0.31 \pm 0.02 a	1.48 \pm 0.05 a	0.48 \pm 0.04 a	8.53 \pm 0.08 a
Dry film (DF)	0.03 \pm 0.00 a	0.17 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.01 b	0.44 \pm 0.02 a	0.29 \pm 0.02 a	1.61 \pm 0.04 a	0.38 \pm 0.04 a	8.59 \pm 0.05 a
Concentration (C)								
10 ⁷ con.mL ⁻¹	0.03 \pm 0.00 a	0.15 \pm 0.00 a	0.16 \pm 0.02 a	0.53 \pm 0.03 a	0.29 \pm 0.03 b	1.54 \pm 0.06 a	0.42 \pm 0.06 a	8.55 \pm 0.01 a
10 ⁸ con.mL ⁻¹	0.03 \pm 0.00 a	0.19 \pm 0.00 a	0.09 \pm 0.02 ab	0.48 \pm 0.03 a	0.22 \pm 0.05 b	1.66 \pm 0.05 a	0.33 \pm 0.05 a	8.68 \pm 0.07 a
10 ⁹ con.mL ⁻¹	0.03 \pm 0.00 a	0.15 \pm 0.00 a	0.00 \pm 0.00 b	0.21 \pm 0.03 b	0.48 \pm 0.03 a	1.46 \pm 0.06 a	0.50 \pm 0.06 a	8.53 \pm 0.11 a

249 For each factor, mean followed by the same letter in the same columns do not differ statistically by Tukey test at 5% probability level.

250

251

252

253

254

255 **4. Discussion**

256 The results obtained based on the assessment of the accumulated mortality of larvae and
257 duration of each larval stage during 24, 48, 72, 96 and 120 hours after application of the fungal
258 suspension showed that the entomopathogenic fungi *M. anisopliae* and *M. rileyi* in concentrations
259 (1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 con.mL⁻¹) and application methods (DA or DF) were selective to larvae of first,
260 second and third instar of *C. externa*. These results corroborate with the selectivity of *M. anisopliae*
261 (E9) previously reported on first instar larvae of *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) [24].

262 The mortality rate in the larval stage of *C. externa* to the fungus *B. bassiana* (ESALQ PL63) was
263 associated with 120 (HAA) of fungal suspension. This period can be considered suitable for the
264 colonization of the chrysopid larvae, since the germination of conidia on the host usually occurs 12
265 hours after inoculation, with the invasion of hemocele in 24 hours, colonization of 3 to 5 days and
266 death of 6 to 7 days after infection [38].

267 In Petri dishes® that received treatment with *B. bassiana* after drying, the excess moisture
268 observed the formation of an adhesive film of white color on the conidia. This movie has
269 maintained the artificial diet adhered to the surface of the Petri dishes® and reduced larvae
270 mobility. The susceptibility of the larval stage of *C. externa* concerning the fungus *B. bassiana* is
271 possibly related to the adhesive aspect that the treatment provided on the Neuroptera exoskeleton.
272 In this case, the product inert BOVERIL® possibly favored the adherence and penetration of the
273 conidia on the cuticle of the *C. externa* larvae. The mode of infection of the entomopathogenic fungi
274 is via integument and involves processes of adherence and penetration of the pathogen on the
275 insect cuticle, overcoming physical and chemical barriers, to later occur the germination [39-41].
276 Previous studies show that the interaction of adjuvants with entomopathogenic fungi *Isaria*
277 *fumosorosea* (isolado ESALQ-1296) and *B. bassiana* (isolado ESALQ-PL63) enhances the pathogen
278 action on the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera, Liviidae), upon the
279 physical and mechanical processes of infection by the integument [43-44]. The selectivity of the
280 entomopathogenic fungi to entomophagous depends on several factors, among them the
281 formulation of emulsifiers, adjuvants, and oils [42].

282 Although there was higher mortality for the larvae infected with *B. bassiana*, the values of
283 average mortality can be considered the low impact, because according to previous studies, the
284 entomopathogens are considered effective when it reaches 40% mortality of hosts [45-48].

285 The present study reports low mortality rates (< 30%) for larvae infected with *B. bassiana*,
286 corroborating with results obtained by other studies that showed selectivity or compatibility of *B.*
287 *bassiana* isolates with low mortality rates (< 30% harmless), on green lacewing species, such as first
288 instar larvae of *Chrysopa exterior* Navás (Neuroptera, Chrysopidae) [49], third instar larvae of *C.*
289 *externa* [23] and the larval stage of *C. externa* [50].

290 Although the present study has evaluated three different concentrations (1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9
291 con.mL⁻¹) for each of the entomopathogenic fungi, the same did not influence the mortality of *C.*
292 *externa* following the increase of conidia. Studies with third instar larvae of *Chrysoperla kolthoffi*
293 Navás (1927) (Neuroptera: Chrysopidae) treated with *M. anisopliae* var. *Anisopliae* showed increase
294 of mortality from the concentration of 1.5×10^8 con.mL⁻¹, and 100% mortality for greater
295 concentration of 1.5×10^{12} con.mL⁻¹ [51]. Generally, the concentrations of entomopathogenic fungi
296 suspensions have not interfered in the development of the biological cycle of third instar larvae of
297 *C. externa*, in which postoperative changes to pre-pupae originated the pupae and subsequently,
298 100% of adults emerged. However, studies with *M. anisopliae* var. *Anisopliae* on instar third-stage
299 larvae of *C. kolthoffi* demonstrated that 75.8% of adults from the treatments belonged to the lowest
300 concentrations (1.5×10^4 and 1.5×10^7 con.mL⁻¹) [52].

301 The variations of duration between the larval stages to pre-pupae and pupae are not related to
302 the treatments with entomopathogenic fungi, concentrations or application methods, because there
303 were variations of these periods in the control treatment and the highest concentrations are not
304 always indicated a greater duration of larval stage, or pre-pupae and pupae. Possibly, the variations

305 in the duration of the larval stages are related to the metabolism of each larva and food
306 consumption during each stage. The exchanges of larval instars of chrysopids are associated with
307 the quantity and quality of prey consumed to meet the nutrient needs of each larval stage because
308 all the reservations of the larval phase will be used in the prepupae and pupae and the initial
309 reproduction phase [36]. Generally, the lowest larval period was recorded for the second instar, a
310 fact that can be attributed to the biological characteristics of the species [53-54]. The duration of the
311 larval stage is an evaluative parameter important, due to the species *C. externa* present habit
312 predator only at the juvenile stage [55-56].

313 The results obtained in this study show that the fungus *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63), *M.*
314 *anisopliae* (isolado ESALQ E9) and *M. rileyi* (isolado UFMS 03) do not interfere with the biological
315 development of larvae of *C. externa* and can be recommended in conjunction aiming at the
316 reduction of populations of arthropod pests, due to low susceptibility of this species of green
317 lacewings in relation to the entomopathogenic fungi under the conditions tested.

318 These results indicate that there are possibilities for new research to validate the selectivity of
319 these isolados concerning the other phases of development of *C. externa*, in addition to the action of
320 other isolados or biobased products on the development of different species of green lacewings of
321 common occurrence in the Brazilian regions.

322 New investigations are justified, even before the high diversity of fungal isolados from Brazil
323 and the importance of determining factors for their virulence, such as the genetic variability of each
324 isolate [57-59], the behavior and physiological condition of the host [60], the defense mechanisms
325 used by insects [61,41,62,63], the lethal dose [64], the compatibility and interaction with the
326 entomophagous [23, 50, 64-66].

327 5. Conclusions

328 The entomopathogenic fungi *M. anisopliae* (isolado ESALQ E9) and *M. rileyi* (isolado UFMS 03)
329 at concentrations (1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 con.mL⁻¹) and application methods (direct or dry film) were
330 selective to larvae of first, second and third instar of *C. externa*. On the other hand, larvae of first,
331 second, and third instar of *C. externa* have low susceptibility to *B. bassiana* (isolado ESALQ PL63),
332 with mortality after 120 hours after application. It is worth noting that the duration of the larval
333 stage and pre-pupae of *C. externa* presented variation (days), regardless of the treatment,
334 concentration, or application methods. The insect's survivors of all treatments reached 100% of the
335 viability of pupae and adults. In the case of corpses of treatment with *B. bassiana* (isolado ESALQ
336 PL63), there has been conidiogenesis about all of them.

337 **Supplementary Materials:** Figure S1. Bioassay of virulence of entomopathogens on the larval stage of
338 *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Figure S2. Emergence of *Chrysoperla externa* (Neuroptera:
339 Chrysopidae), after application of treatments on third instar larvae. Figure S3. Conidiogenesis of *Beauveria*
340 *bassiana* (isolado ESALQ PL63), on cadavers of *Chrysoperla externa* with mortality 120 hours after application.

341 **Author Contributions:** P.M.D. developed the project, assembled the experiment, collected and analyzed the
342 data, and wrote the manuscript. E.S.L. helped, guided, and oversaw the writing of the project and assembly of
343 the experiment; provided funds for the purchase of materials; and reviewed the manuscript.

344 **Funding:** This research was funded by (FUNDECT) - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino de
345 Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, MS, Brazil, grant number (59/300.513/2016).

346 **Acknowledgments:** We thank the Graduate Program of Entomologia e Conservação da Biodiversidade,
347 PPGECEB-UFMS, Dourados, MS. The Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino Ciência e Tecnologia
348 do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT). This study was financed in part by the Coordenação de
349 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), finance Code 001, and the Conselho Nacional
350 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), finance code: 001; The Federal University of Mato

351 Grosso do Sul, (UFMS), for the resources to publish this manuscript; The members of the research group
352 LAMIP.

353 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

354 References

- 355 1. Oswald, J. D. Neuropterida Species of the World, 2018. Disponível em:<
356 <http://lacewing.tamu.edu/SpeciesCatalog/Main>>. (accessed on: 03 July 2019).
- 357 2. Maia, W. J. M. S. Carvalho, C. F.; Souza, B.; Cruz, I.; Maia, T.J.A.F. *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856)
358 (Hemiptera: Aphididae). *Ciência e Agrotecnologia* **2004**, *28*, 1259-1268.
- 359 3. Pessoa, L.G.A.; Leite, M.V.de; Freitas, S.; Garbin, G.C. Efeito da variação da temperatura sobre o
360 desenvolvimento embrionário e pós embrionário de *Ceraeochrysa paraguayaria* (Navás) (Neuroptera:
361 Chrysopidae) *Arq. Inst. Biol.* **2004**, *71*, 473-476.
- 362 4. Pitwak, J.; Menezes JR., A. O.; Ventura, M. U. Development and reproductive performance of *Chrysoperla*
363 *externa* (Neuroptera: Chrysopidae) using preys from wheat crop. *Rev. Colomb. Entomol.* **2016**, *42*, 118-123.
- 364 5. Pasini, R.A. Seletividade de agrotóxicos utilizados na cultura do trigo aos predadores *Chrysoperla externa*
365 (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) e *Eriopis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Coccinellidae) em
366 condições de laboratório e semi-campo. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade.
367 Universidade Federal de Pelotas, Pelotas RS, 2017, 154 p. (In Portuguese)
- 368 6. Silva, B. K. de A.; Godoy, M. S. de; Lima, A. G. de; Oliveira, A. K. S. de; Pastori, P.L. Toxicity of
369 insecticides used in muskmelon on first-instar larvae of *Chrysoperla genanigra* Freitas (Neuroptera:
370 Chrysopidae). *Rev. Caatinga* **2017**, *30*, 662-669, doi:10.1590/1983-21252017v30n314rc. (Accessed on: 02
371 July 2019).
- 372 7. Hewlett, J. A., Szczepaniec, A.; Eubanks, M. D. The effects of sugarcane aphid density in sorghum on
373 predation by lady beetles and lacewings. *Biol. Control* **2018**, *129*, 171-177,
374 doi:10.1016/j.biocontrol.2018.10.015.
- 375 8. Armas, F. S de ; Grützmacher, A. D.; Nava, D. E.; Rakes, M.; Bueno, Amaral, F.; Pasini, R. A. Selectivity of
376 pesticides used in peach orchards to eggs and pupae of the predators *Chrysoperla externa* and *Coleomegilla*
377 *quadrifasciata*. *Semina: Ciênc. Agrá.*, **2019**, *40*, 1427-1440.
- 378 9. Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S. Insect pathogens
379 as biological control agents: back to the future. *J. Invert. Pathol.* **2015**, *132*, 1–41, doi:10.1016/j.jip.2015.07.009.
- 380 10. Zimmermann, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria*
381 *fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological
382 control. *Biocont. Sci. Technol.* **2008**, *18*, 865-901.
- 383 11. Mora, M.A.E.; Castilho, A.M.C.; Fraga, M.E. Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que
384 afetam a diversidade. *Rev. Bras. de Prod. Agroind.* **2016**, *18*, 335-349.
- 385 12. Bueno, A. de F.; Carvalho, G. A.; Santos, A. C. dos; Sosa-Gómez, D. R.; Silva, D. M. da. Pesticide selectivity
386 to natural enemies: challenges and consiladots for research and field recommendation. *Ciência Rural* **2017**,
387 *47*: 06, 1-10, doi:10.1590/0103-8478cr20160829. (Accessed on: 02 July 2019).
- 388 13. Fernandes, F.L.; Bacci, L.; Fernandes, M.S. Impact and selectivity of insecticides to predators and
389 parasitoids. *EntomoBrasilis* **2010**, *3*, 1-10.
- 390 14. Bueno, A. de F.; Batistela, M. J.; Bueno, R. C. O. de F.; França-Neto, J. de B., Nishikawa, M. A. N.; Libério
391 Filho, A. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on
392 the management and sustainability of soybean. *Crop Protection* **2011**, *30*, 937-945, doi:
393 10.1016/j.cropro.2011.02.021. (Accessed on: 07 July 2019).
- 394 15. Ndakidemi, B., Mtei, K.; Ndakidemi, P. A. Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial
395 insects. *Agricultural Sciences* **2016**, *07*, 364-372, doi:10.4236/as.2016.76038. (Accessed on: 08 July 2019).
- 396 16. Sosa-Gómez, D.R. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. 2006. Accessed: July 20,
397 2019.
- 398 17. Rimoldi F.; Schneider M. I.; Ronco, A. Short and long-term effects of endosulfan, cypermethrin, spinosad,
399 and methoxyfenozide on adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *J Econ. Entomol.* **2012**,
400 *105*, 1982–1987, doi:10.1603 / ec12189. (Accessed on: 01 July 2019).

- 401 18. Rugno, G. R.; Zanardi, O. Z.; Yamamoto, P. T. Are the Pupae and Eggs of the Lacewing *Ceraeochrysa*
 402 *cubana* (Neuroptera: Chrysopidae) Tolerant to Insecticides? *Journal of Economic Entomology*, **2015**, *108*, 2630–
 403 2639, doi:10.1093/jee/tov263. (Accessed on: 01 July 2019).
- 404 19. Pasini, R. A.; Grützmacher, A. D.; Pazini, J. de B.; Armas, F.S de; Bueno, F. A.; Pires, S.N. Side effects of
 405 insecticides used in wheat crop on eggs and pupae of *Chrysoperla externa* and *Eriopsis connexa*.
 406 *Phytoparasitica* **2018**, *46*, 115–125, doi: 10.1007/s12600-018-0639-9. (Accessed on: 01 July 2019).
- 407 20. Soares, A. de F.; Carvalho, G. A. Physiological selectivity of insecticides to eggs and larvae of predator
 408 *Chrysoperla externa* (HAGEN) (Neuroptera: Chrysopidae). *Coffee Science* **2018**, *13*, 292 – 303.
- 409 21. Rugno, G.R.; Zanardi, O.Z.; Parra, J.R.P.; Yamamoto, P.T. Lethal and Sublethal Toxicity of Insecticides to
 410 the Lacewing *Ceraeochrysa Cubana*. *Neotrop. Entomol.* **2019**, *48*, 162–170, doi:10.1007/s13744-018-0626-3.
 411 (Accessed on: 01 July 2019).
- 412 22. Generoso, A.R. Compatibility of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* with *Chrysoperla externa*
 413 (Neuroptera: Chrysopidae) and Methodology for Evaluating Selectivity. Master's Thesis (Master in
 414 Entomology), Paulista State University, Jaboticabal-SP, Brazil, 2002; p. 63.
- 415 23. Pessoa, L.G.A.; Cavalcanti, R.S.; Moino Junior, A.; Souza, B. Compatibility between *Beauveria bassiana* and
 416 predator *Chrysoperla externa* in the laboratory. *Pesq. Agropecu. Bras.* **2005**, *40*, 617– 619.
- 417 24. Cardoso, E.R.; Freitas, S.; Nunes, H.T.; Pessoa, L.G.A. Selectivity of *Lecanicillium lecanii* and *Metarhizium*
 418 *anisopliae* for first instar larvae of *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory. *Acta Sci.*
 419 *Agron.* **2007**, *29*, 563–568.
- 420 25. Schlick, E.C., Toscano, L.C.; Souza, G.D.; Peres, A.J.A.; Dias, P.M.; Maryama, W.I. Compatibilidade de
 421 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) com *Chrysoperla externa*
 422 (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *EntomoBrasilis* **2015**, *8:3*, 189-195. (In Portuguese)
- 423 26. Consechi, M.R. Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o
 424 manejo de *Diaphorina citri* Tese (Doutorado)- USP/ Escola Superior “Luiz de Queiroz” 2017, 134 p. (In
 425 Portuguese).
- 426 27. Dias, P. M.; Almeida Filho, L.M.; Pessoa, L.G.A.; Loureiro, E.S.; Ramalho, K.F. Production of *Metarhizium*
 427 *rileyi* in different mixtures of rice and sorghum In XII Agronomic Week Cassilândia & V week of Research
 428 of the Post-graduation, Proceedings of the V week of Postgraduate Research, Cassilândia, MS, 2017. p. 99 -
 429 99.
- 430 28. Freitas, S. *Chrysoperla Steinmann*, 1964 (Neuroptera: Chrysopidae): description of a new species from
 431 Brazil. *Rev Bras Entomol.* **2003**, *47*, 385-387.
- 432 29. Dias, P.M.; Loureiro, E.S.L.; Pessoa, L.G.A; Oliveira Neto, F.M.; Tosta, R.A.S.; Teodoro, P.E. Interactions
 433 between Fungal-Infected *Helicoverpa armigera* and the Predator *Chrysoperla externa*. *Insects* **2019**, *10*, 1-11.
 434 doi:10.3390/insects10100309.
- 435 30. Ribeiro, M.J. Biology of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera, Chrysopidae) fed with different
 436 diets. Dissertation (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG,
 437 Brazil, 1988.
- 438 31. Bortoli, S.A.; Caetano, A.C.; Murata, A.T.; Oliveira, J.E.M. Development and predatory ability of
 439 *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) in different prey. *Bioterra* **2006**, *6*, 154-152.
- 440 32. Thungrabeab, M.; Angma, S. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (BALSAM) and
 441 *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non-target insects. *KMITL Sci Tech J* **2007**, *7*, 1.
- 442 33. Hassan, S.A. Standardized techniques for testing side-effects of pesticides on beneficial arthropods in the
 443 laboraary. *ZeitschriftfUr Pflanzenkrankheiten und Flanzenschutz* **1977**, *84*, 158-163.
- 444 34. Hassan, S.A. Standard methods a test the Sideeffects of pesticides on natural enemies of insects and mites
 445 developed by the IOBC/WPRS Wprk Group "Pesticides and Beneficial Organisms". *EPPO Bull* **1985**, *15*,
 446 214-255.
- 447 35. Freitas, S.; Penny, N. D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems.
 448 *Proceedings of the California Academy Sciences* **2001**, *50*, 245-395.
- 449 36. Alberquerque, S.A. Green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). In *The Bioecology and nutrition of insects:*
 450 *basis for the integrated management of pests*, 1st ed; Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. Brasilia, Embrapa Technological
 451 Information, 2009; Volume 23, pp. 969-1022.
- 452 37. Bhering, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. *Crop Breed Appl*
 453 *Biotech* **2017**, *17*, 187-190.
- 454 38. Alves, S.B.; Lopes, R.B. *Microbial Control of Pests in Latin America*; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 2008; p. 414.

- 455 39. Alves, S.B.; Milk, L.H.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Marques, E.J. Massal production of
 456 entomopathogenic fungi in Latin America. In *Microbial Control of Pests in Latin America*, 2nd ed.; Alves,
 457 S.B., Lopes, R.B., Eds.; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 2008; pp. 215–237.
- 458 40. ST Leger, R.J.; Wang, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect
 459 pests. *Appl. Microb. and Biotec.* **2010**, *85*, 901-907.
- 460 41. Wang, C., Feng M.G. Advances in fundamental and applied studies in china of fungal biocontrol agents
 461 for use against arthropod pests. *Biol Control* **2014**, *68*, 129-135.
- 462 42. Alves, S.B.; Moino JR, A.; Almeida, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves, S.B.
 463 *Controle microbiano de insetos* (Ed.), 1998, 217-238.
- 464 43. Ausique, J.J.S.; D'Alessandro, C.P.; Conceschi, R.M.; Mascarin, G.M.; Delalibera, I.J. Eficácia de fungos
 465 entomopatogênicos contra adultos de *Diaphorina citri* para aplicações de laboratório em campo. *Journal of*
 466 *Pest Science* **2017**, *90*, 947–960, doi: 10.1007/s10340-017-0846-z. (Accessed on: 05 July 2019).
- 467 44. Arnosti, A., Delalibera Junior, I., Conceschi, M.R., D'Alessandro, C.P., Travaglini, R.V., Camargo-Mathias,
 468 M.I. Interactions of adjuvants on adhesion and germination of *Isaria fumosorosea* on adults of *Diaphorina*
 469 *citri*. *Scientia Agricola*, **2019** 76:6, 487-493, doi: 10.1590/1678-992x-2017-0240_(Accessed on: 06 July 2019).
- 470 45. Alves, S.B., Padua, L.E.M., Azevedo, E.M.V.M., Almeida, L.C. Controle da broca da cana-de-acucar pelo
 471 uso de *Beauveria bassiana*. *Pesq. Agrop.Brasil.* **1985**, *20*, 403-406.
- 472 46. Faria, L.L.F., Oliveira, J.V., Barros, R. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em lagartas
 473 de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) sob condições de Laboratorio.
 474 *Cad.Omega* **1991**, 207-217.
- 475 47. Lecuona, R.E., Tigano, M.S., Diaz, B.M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against
 476 *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera; Pyralidae) in Argentina. *An. soc.Entomol.Brasil* **1996**, *25*, 299-307.
- 477 48. Silva, R.B.Q.; Veiga, A.F.S.L. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
 478 Sorok. sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). *Rev. Agric.* **1998**, *73*, 119-127.
- 479 49. Leyva, O.E.; Villalon, E.M.; Ávila, R.A.; Bulet, D.B. B. Susceptibilidad de *Chrysopa exterior* Navas a
 480 *Beauveria bassiana* (Blasamo) Vuillemin cepa LBB-1 en condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*, **2011**, *15*, 51–
 481 57.
- 482 50. López, M.A.C., Osorio, J.W.M. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* com
 483 *Chrysoperla externa* depredador de *Trialeurodes vaporariorum*. *Chliean ean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*,
 484 **2019**, *35*, 38-48.
- 485 51. Ventura, M.A., Ribeiro, C., Garcia, V., Canard, M. Aspöck, H., Mansell, M.W. Susceptibility of third instar
 486 larvae of the green lacewing *Chrysoperla kolphoffi* (Navas) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium*
 487 *anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch in the laboratory (Insecta: Neuroptera:
 488 Chrysopidae). Pure and applied research in neuropterology. In: International Symposium on
 489 Neuropterology: Insecta: Neuroptera, Megaloptera, Raphidioptera, 1. Cairo, Egypt. Proceedings. Cairo,
 490 Egypt. 241-249, 1996.
- 491 52. Ventura, M.A., Garcia, V., Canard, M. Efeito da antibiose causado pelo fungo entomopatogênico
 492 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin variedade *anisopliae* Tulloch, a uma "crisma verde comum"
 493 *Chrysoperla kolphoffi* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae). *Jour. of Neuropterology* **2000**, *3*, 33-41.
- 494 53. Maia, W.J.S.; Carvalho, C.F.; Souza, B.; Exigências térmicas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861)
 495 (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae)
 496 em condições laboratório. *Ciência e Agrotecnologia* **2000**, *24*, 81-86.
- 497 54. Silva, C. G. Desenvolvimento das fases imaturas de *Chrysoperla externa* alimentadas com ninfas de *Bemisia*
 498 *tabaci* criadas em três hospedeiros. *Pesq. Agrop. Brasil.* **2004**, *39*:11, 1065-1070.
- 499 55. Canard, M.; Principi, M.M. Life histories and behavior. In: Canard, M.; Séméria, Y.; New, T.R. (eds).
 500 *Biology of Chrysopidae*. The Hague-NL: W. Junk Publishers, 1984. p. 57-149.
- 501 56. Soares, J.J.; Almeida, M.G. de M. *Metodologia para a criação de Chrysoperla externa*. Campina Grande:
 502 Embrapa Algodão, 2001. 3 p. (Embrapa-Algodão, Comunicado Técnico, 135).
- 503 57. Gupta, S., Krasnoff, S. B., Roberts, D.W., Renwick, J.A.A., Brinen, L. S, Clardy, J. Structure of efrapeptins
 504 from the fungus *Tolyocladium niveum*: peptide inhibitors of mitochondrial ATPase. *J. Org. Chem.* **1992**,
 505 *57*, 2306-2313, doi:10.1021/jo00034a022. (Accessed on: 07 July 2019).
- 506 58. Vestergaard, S.; Gillespie, A.T.; Butt, T.M.; Schreiter, G.; Eilenberg, J. Pathogenicity of the Hyphomycete
 507 fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol*
 508 *Science and Technology*, **1995**, *5*, 185-192.

- 509 59. Leal, S.C.M., Bertoli, D.J., Butt, T.M., Carter, J.H., Burrows, P.R., Peberdy, J.F. Amplification and
 510 restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium*
 511 *anisopliae*. *Mycological Research* **1997**, *101*, 257-265.
- 512 60. Lacey, L.A., Goettel, L.A. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the
 513 early 21st century. *Bio Control* **1995**, *40*, 3-27.
- 514 61. Hajek AE; Eastburn CC. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and
 515 non-host larval cuticle. *J Invertebr Pathol.* **2003**, *82*, 12-22, doi:10.1016/s0022-2011(02)00198-2. (Accessed on:
 516 05 July 2019).
- 517 62. Bianco, L., Perrota, G. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from
 518 sample preparation to secretoma analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, **2015**, *16*, 5803-5820.
- 519 63. Ruiz, A.C. Virulência de *Nomuraea rileyi* à *Spodoptera frugiperda* e perfil protéico do secretoma em presença
 520 da cutícula do inseto. (Dissertação) Mestrado Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande
 521 do Sul, 38 p., 2016. (In Portuguese).
- 522 64. Portilla, M. Snodgrass, G., Luttrell, R. Lethal and Sub-Lethal Effects of *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae)
 523 Isolado NI8 on *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). *Flor. Entomol.* **2017**, *100*, 627-633,
 524 doi:10.1653/024.100.0321. (Accessed on: 08 July 2019).
- 525 65. Leyva, O. E.; O. E.; Villalón, E. M.; Ávila, R. A.; Bulet, D. B. Susceptibilidad de *Chrysopa exterior* Navás a
 526 *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin CEPA EPA LBB-1 en condiciones de laboratorio. *Fitosanidad* **2011**,
 527 *15*, 51-57.
- 528 66. Portilla, M.; Luttrell, R.; Snodgrass, G.; Zhu, Y.C.; Riddick, E. Lethality of the entomopathogenic fungus
 529 *Beauveria bassiana* NI8 isolado in *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and its possible impact on beneficial
 530 arthropods. *J. Entomol. Sci.* **2017**, *52*, 352-369, doi: 10.18474/JES17-15.1. (Accessed on: 08 July 2019).
 531



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo III⁴
Interactions between Fungal-Infected *Helicoverpa armigera* and the Predator
Chrysoperla externa

⁴ Este capítulo segue as normas da Revista Insects. Publicação disponível em:<Insects 2019, 10, 309; doi:10.3390/insects10100309>.

1 Article

2 Interactions between Fungal-Infected *Helicoverpa* 3 *armigera* and the Predator *Chrysoperla externa* 4

5 Pamella Mingotti Dias ^{1,*}, Elisângela de Souza Loureiro ^{1,2}, Luis Gustavo Amorim Pessoa ²,
6 Francisco Mendes de Oliveira Neto ², Ricardo Alexandre de Souza Tosta ² and Paulo Eduardo
7 Teodoro ²

8 ¹ Graduate Program in Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Universidade Federal da
9 Grande Dourados, Dourados 79.804-970, MS, Brazil;

10 ² Agronomy Universidade Federal of Mato Grosso do Sul (CPCS), Chapadão do Sul, 79.560-000, MS, Brazil;
11 (L.G.A.P.); (F.M.d.O.N.); (R.A.d.S.T.); (P.E.T.)

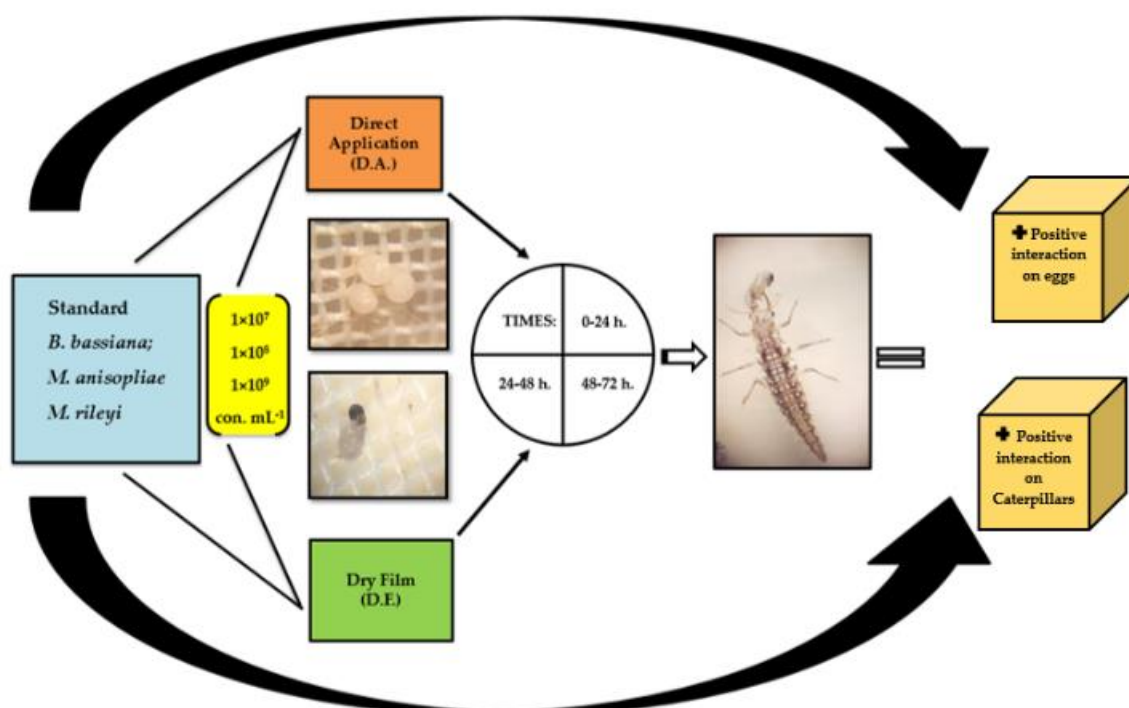
12 * Correspondence: pamellamingotti@hotmail.com

13 Received: 27 June 2019; Accepted: 6 September 2019; Published: 20 September 2019.

14 **Abstract:** The aim of the present study was to evaluate the interactions between *Chrysoperla externa*
15 (Hagen, 1861) and the eggs and first-instar larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) infected by
16 entomopathogenic fungi. The *H. armigera* eggs and larvae were treated with sterile distilled water
17 + 0.01% Tween 80 (T1, control), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (T2), *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
18 Sorok (T3), or *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson. (T4) at different concentrations (1×10^7 , 1×10^8 ,
19 and 1×10^9 con. mL⁻¹). For each treatment, a single third-instar *C. externa* was offered prey (a
20 combination of 80 eggs and 50 first-instar *H. armigera* larvae) at 0, 24, and 48 h after inoculation.
21 Ten trials were completed for each treatment, and the entire experiment was repeated three times.
22 Neither the concentrations of fungi nor the application method affected consumption by *C. externa*.
23 Because all the predator larvae reached the pupal phase, with 100% viability in adults, these
24 results suggest that entomopathogenic fungi and *C. externa* are compatible and that the
25 simultaneous use of these biological control agents is possible for managing *H. armigera*.

26 **Keywords:** Lepidoptera; Hypocreales; biological control; green lacewing; integrated pest
27 management; compatibility

28 Graphical abstract



30

31 **1. Introduction**

32 The occurrence of lepidopteran pests at high population densities has led to major economic
33 losses in the agricultural and forestry sectors of Brazil [1]. The cotton caterpillar *Helicoverpa armigera*
34 (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) was considered in Brazil, a quarantine pest, with reports
35 during occurrence and major damage of the 2013/2014 agricultural year [2]. *H. armigera* has a high
36 potential to become a pest in countries into which it enters because the adults are capable of
37 migration and possess high reproductive potential [3,4], whereas the larvae exhibit aggressive,
38 polyphagous, and destructive eating habits, indiscriminately consuming both the vegetative and
39 reproductive structures (e.g., flowers, pods, and fruits) of a variety of agricultural crops [5–7].
40 Furthermore, the succession and crop rotation systems used in Brazil promote damage by *H.*
41 *armigera* by providing abundant food resources [8].

42 The interactions between populations from different regions [9], poorly structured pest
43 management programs, and indiscriminate insecticide use have contributed to the selection
44 pressure that has led *H. armigera* populations to develop resistance to approximately 49 active
45 ingredients of commercially available insecticides [10,11]. Effective integrated pest management
46 (IPM) must involve a well-architected structure that includes a variety of tools, including
47 biological control agents, entomopathogenic fungi, and insect predators [12–16]. Confirmatory
48 studies of pathogenicity and virulence of entomopathogenic fungi on *H. armigera* have been
49 presented [17] using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill [18], *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok
50 [19,20] and *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson [21].

51 Environmental factors such as temperature and precipitation can negatively affect the
52 pathogenicity, virulence, and survival of entomopathogenic fungi. The combination of
53 entomopathogenic fungi and other control agents such as predators may be a viable alternative in
54 pest management [22]. Among entomophagous insects, the green lacewing, *Chrysoperla externa*
55 (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), a voracious predator that is highly abundant and easy to
56 culture in the laboratory, has gained attention in research into biological control [23,24].

57 The efficacy of entomopathogenic fungi depends on their high virulence, in regard to
58 arthropod pests, as well as on their selectivity and low virulence toward non-target insects [25].
59 Studies in Brazil have demonstrated the compatibility of fungal and lacewing species [26–29], and
60 Chrysopidae have also been demonstrated as effective consumers of lepidopteran eggs [30–33],
61 including those of *H. armigera* [34]. However, there is still much to learn about the effect of
62 entomopathogenic fungi on the green lacewing, especially regarding its consumption of infected
63 prey.

64 Studies that have investigated the direct and indirect effects of entomopathogens on predators
65 and parasitoids have mostly focused on the direct application of fungal suspensions and have
66 generally reported that higher doses are correlated with greater negative effects [35].

67 The genera *Beauveria* and *Metarhizium* may present endophytic action on plants providing
68 better physiological performance and reducing the population arthropod-pests through synergism
69 between predators and parasitoids [35,36]. It has been reported by [37,38] that the interaction
70 between entomopathogenic fungi and the predator of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae)
71 is beneficial, thus enabling the joint application of these biocontrol organisms in aphid
72 management.

73 The objective of the present study was to evaluate the interaction between *C. externa* and the
74 eggs and first-instar larvae of *H. armigera* treated with different concentrations of *B. bassiana* (isolate
75 ESALQ PL63), *M. anisopliae* (isolate ESALQ E9), or *M. rileyi* (isolate UFMS 03).

76

77

78 2. Materials and Methods

79 2.1. Collection and Rearing of *H. armigera*

80 During the 2018–2019 growing season, *H. armigera* adults and larvae of different ages were
81 collected from soybean fields at the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campus of
82 Chapadão do Sul, MS, Brazil) that had not been sprayed with chemicals. In the laboratory, the *H.*
83 *armigera* larvae were transferred to plastic containers (16 insects per container; 25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$
84 RH (relative humidity), and photoperiod 12 h day and 12 h night and daily fed an artificial diet
85 mainly composed of white beans adapted from [39]. The *H. armigera* pupae were separated by sex
86 and, were assembled into male–female pairs, totaling sixteen adults per cage, using methods
87 [40,41].

88 2.2. Collection and Rearing of *C. externa*

89 Adults of *C. externa* were identified from collections made in the same area mentioned above in
90 and using the method [42], and were later transferred to an acclimatized room (25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$
91 RH, and photoperiod of 12 h day and 12 h night). Within the room, the collected adults were kept in
92 PVC (Polyvinyl chloride) cages (height 23 cm, diameter 10 cm) that were lined with white bond
93 paper (for oviposition), with the lower end supported by styrofoam lined with a paper towel and
94 the upper end sealed with “VOILE fabric”. An artificial diet of beer yeast and honey [43] was
95 provided using an adapted feeder, which was composed of a soft sponge containing paste-shaped
96 diet over the top base and the bottom part inserted into a 10-mL cylindrical tube with distilled
97 water. This adaptation allowed the sponge to be constantly humidified by constantly providing
98 water and food. At 24 h after oviposition, eggs were removed from the oviposition substrate using
99 either scissors or a fine plastic comb. The eggs (10 each) were then transferred to 500-mL plastic
100 containers that had been properly sanitized using 70% alcohol and 12 h of UV irradiation. The
101 containers (i.e., cages) contained strips of paper to create a refuge for the larvae against cannibalism.
102 Larvae were fed with eggs of *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) daily until
103 sufficient numbers of larvae were available for bioassays [34].

104 2.3. Fungal Isolates

105 *Beauveria bassiana* (isolate ESALQ PL63) and *M. anisopliae* (isolate ESALQ E9) were extracted
106 from the commercial mycoinsecticides BOVERIL® and METARRIL®, respectively (Koppert
107 Biological Systems, Piracicaba, SP, Brazil), whereas *Metarhizium rileyi* (UFMS 03) was obtained from
108 the entomopathogen bank of the Entomology Laboratory of the Universidade Federal de Mato
109 Grosso do Sul (Campus of Chapadão do Sul, MS, Brazil). However, because no commercial
110 formulas contain *M. rileyi* (UFMS 03), this isolate was produced using Sabouraud media and
111 previously reported methods (25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ RH, and photoperiod of 12 h day and 12 h night)
112 [44]. To prepare fungal suspensions, the isolates were diluted using sterile distilled water that
113 contained 0.01% (*v/v*) Tween80®, and the conidia were counted using a Neubauer chamber to
114 standardize the concentrations [45].

115 2.4. Interaction between *C. externa* and Fungi-Treated *H. armigera*

116 The bioassay was performed in the laboratory under the following conditions: (25 ± 1 °C, $70 \pm$
117 10% RH, and photoperiod of 12 h day and 12 h night). Two prey stages, (eggs and caterpillars) were
118 used in separate experiments.

119 For the egg bioassay, each *C. externa* larvae received 80 *H. armigera* eggs (>12 h). In the
120 caterpillar bioassay, each *C. externa* larvae received 50 first-instar *H. armigera* larvae (1 to 3 mm
121 long). These prey were made available to the predator in 250 mL plastic containers that were
122 properly sanitized with 70% alcohol and 12 h of UV irradiation.

123 The *H. armigera* eggs and larvae were treated with sterile distilled water + 0.01% Tween 80 (T1,
124 control), *B. bassiana* (T2), *M. anisopliae* (T3), or *M. rileyi* (T4) at different concentrations (1×10^7 , $1 \times$
125 10^8 , and 1×10^9 con. mL⁻¹), and a control treatment was included for each exposure time (0, 24 and
126 48 h) and using either direct application (D.A.) or dry film (D.F.) application methods. The
127 treatments were applied using an adapted Potter Tower, with a pressure of 1.5 MPa. For the direct
128 application, fungal suspensions and control treatment were applied directly to eggs, larvae and
129 plastic containers [46] after the dry surface (time zero), with release of *C. externa*, whereas the dry
130 film method was applied only in the containers, with transfer of eggs and larvae of *H. armigera* to
131 the plastic container containing the larvae of *C. externa* after drying the excess moisture [47]. The
132 protocol proposed by the International Organization for Integrated Biological and Control of
133 Harmful Animals and Plants, Western Palaearctic Regional Section was used to standardize
134 selectivity tests for entomopathogens [48].

135 For each treatment, a single third-instar larvae of *C. externa*, after 24 h of fasting, was offered
136 prey (80 eggs and 50 first-instar *H. armigera* larvae) at 0, 24, and 48 h after inoculation. The choice of
137 this predator instar refers to the most voracious larval age. In the third instar, green lacewing can
138 reach 72–85% prey consumption equivalent to the predatory capacity of the entire larval phase,
139 depending on prey type [49].

140 After the start of each test, the containers were sealed with plastic film and plastic caps with
141 small ventilation holes and stored in a biological oxygen demand (B.O.D) chamber under the
142 following conditions: 25 ± 1 ° C, $70 \pm 10\%$ RH, and photoperiod of 12 h day and 12 h night. The
143 performance of *C. externa* was evaluated over a 24-h period, and performance was assessed on the
144 basis of mean number of eggs and larvae consumed, ability to detect infected prey, and the
145 interactive behaviors of both the predators and prey.

146 In order to evaluate the conidia recovery, three inoculated insects from each replicate were
147 washed using sterile distilled water with 0.01% Tween80®, and then the number of conidia was
148 estimated using a Neubauer counting chamber, (Boeco®), Lab-Líder, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

149 We performed three replicates of the bioassay of the interaction between *C. externa* and
150 inoculated *H. armigera* eggs and larvae.

151 2.5. Statistical Analysis

152 The present study involved a completely randomized experimental design (DIC) that included
153 factorial arrangement ($4 \times 3 \times 2$), with four treatments (P), three suspension concentrations (C), and
154 two application methods (A). Each trial included a third-instar *C. externa* larva, 80 *H. armigera* eggs,
155 and 50 first-instar *H. armigera* larvae, and 10 replicates were performed for each combination of
156 treatment, suspension concentration, and application method.

157 The consumption of inoculated *H. armigera* eggs and larvae after 0, 24, 48, and 72 h was
158 normally distributed. Therefore, the data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and
159 means were compared using the Tukey test, at 5% probability, using Rbio [50] and Genes [51].

160 3. Results

161 3.1. Interaction between *C. externa* and Fungi-Treated *H. armigera* Eggs

162 Neither product (P), application method (A), suspension concentration (C), or interactions
163 between these factors ($A \times P$, $A \times C$, $P \times C$, or $A \times P \times C$) significantly affected the consumption of *H.*
164 *armigera* eggs by *C. externa*, regardless of exposure time ($p > 0.05$; Table 1), and the *C. externa* larvae
165 consumed statistically equivalent numbers of *H. armigera* eggs, regardless of treatment (vs. control),
166 product, application method, suspension concentration, or exposure time (Table 2).

167

168 **Table 1.** ANOVA table for the interactions between the factors studied and the consumption of eggs
 169 of *H. armigera* in different times (0, 24, 48, and 72 h) of exposure to *C. externa* (T: 25 ± 1 °C, RH of $70 \pm$
 170 10% and photoperiod of 12 h day and 12 h night).

SV	DF	0–24 h	24–48 h	48–72 h
Application (A)	1	1.62 ^{ns}	3.12 ^{ns}	231.12 ^{ns}
Product (P)	3	1.84 ^{ns}	14.54 ^{ns}	68.00 ^{ns}
Concentration (C)	3	2.27 ^{ns}	1.41 ^{ns}	7.49 ^{ns}
A × P	3	10.86 ^{ns}	1.51 ^{ns}	31.55 ^{ns}
A × C	3	4.67 ^{ns}	0.34 ^{ns}	6.78 ^{ns}
P × C	9	7.65 ^{ns}	1.18 ^{ns}	7.59 ^{ns}
A × P × C	9	0.69 ^{ns}	1.60 ^{ns}	6.85 ^{ns}
Residue	180	62.36 ^{ns}	78.11 ^{ns}	78.29 ^{ns}

171 ns: not-significance at 5% probability by F-test. SV: source of variation; DF: degrees of freedom;
 172 Numbers are F-values.

173 **Table 2.** Mean consumption (mean \pm standard error) of eggs of *H. armigera* infected with *B. bassiana*
 174 and *M. anisopliae* and *M. rileyi* in times (0, 24, 48 and 72 h) of exposure to *C. externa* (T: 25 ± 1 °C, RH
 175 of $70 \pm 10\%$, and photoperiod of 12 h day and 12 h night).

Application (A)	0–24 h	24–48 h	48–72 h
Direct (D.A.)	72.28 \pm 0.86 a	71.01 \pm 0.82 a	68.51 \pm 0.84 a
Dry film (D.F.)	72.10 \pm 0.63 a	70.76 \pm 0.85 a	66.36 \pm 0.88 a
Product (P)			
Control	73.50 \pm 1.19 a	72.25 \pm 1.69 a	69.30 \pm 3.16 a
<i>B. bassiana</i>	72.20 \pm 3.19 a	70.61 \pm 4.00 a	66.41 \pm 4.04 a
<i>M. anisopliae</i>	71.56 \pm 3.71 a	70.88 \pm 2.54 a	68.38 \pm 2.87 a
<i>M. rileyi</i>	72.36 \pm 2.55 a	70.70 \pm 3.91 a	66.88 \pm 3.35 a
Concentration (C)			
10 ⁷ con. mL ⁻¹	72.10 \pm 1.17 a	70.95 \pm 1.14 a	67.13 \pm 1.15 a
10 ⁸ con. mL ⁻¹	71.78 \pm 0.90 a	70.61 \pm 0.95 a	66.85 \pm 1.06 a
10 ⁹ con. mL ⁻¹	72.25 \pm 0.93 a	70.63 \pm 1.25 a	67.70 \pm 1.07 a

176 For each factor (application, product or concentration), means followed by letters equal in the same
 177 column do not differ statistically by Tukey test at 5% probability.

178 3.2. Interaction between *C. externa* and Fungi-Treated *H. armigera* Larvae

179 Neither product (P), application method (A), suspension concentration (C), or interactions
 180 between these factors (A × P, A × C, P × C, or A × P × C) significantly affected the consumption of *H.*
 181 *armigera* larvae by *C. externa*, regardless of exposure time ($p > 0.05$; Table 3), and the *C. externa* larvae
 182 consumed statistically equivalent numbers of *H. armigera* eggs, regardless of treatment (vs. control),
 183 product, application method, or suspension concentration (Table 4).

184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193

194 **Table 3.** ANOVA table for the interactions between the factors studied and the consumption of
 195 larvae of *H. armigera* in different times (0, 24, 48 and 72 h) of exposure a *C. externa* (T: 25 ± 1 °C, RH
 196 of 70 ± 10% and photoperiod of 12 h day and 12 h night).

SV	GL	0–24 h	24–48 h	48–72 h
Application (A)	1	32.00 ^{ns}	3.12 ^{ns}	0.04 ^{ns}
Product (P)	3	34.30 ^{ns}	8.80 ^{ns}	2.34 ^{ns}
Concentration (C)	3	20.27 ^{ns}	0.77 ^{ns}	0.41 ^{ns}
A × P	3	1.46 ^{ns}	0.45 ^{ns}	0.30 ^{ns}
A × C	3	20.07 ^{ns}	1.34 ^{ns}	2.23 ^{ns}
P × C	9	3.02 ^{ns}	4.34 ^{ns}	0.69 ^{ns}
A × P × C	9	10.62 ^{ns}	0.56 ^{ns}	0.85 ^{ns}
Residue	180	26.41 ^{ns}	0.41 ^{ns}	18.56 ^{ns}

197 ns: not-significance at 5% probability by F-test. SV: source of variation; DF: degrees of freedom;
 198 Numbers are F-values.

199 **Table 4.** Consumption (mean ± standard error) of larvae of *H. armigera* infected with *B. bassiana*, *M.*
 200 *anisopliae* and *M. rileyi* in times (0, 24, 48 and 72 h) of exposure a *C. externa* (T: 25 ± 1 °C, RH of 70 ±
 201 10% and photoperiod of 12 h day and 12 h night).

Application (A)	0–24 h	24–48 h	48–72 h
Direct (D.A.)	45.54 ± 0.68 a	46.54 ± 0.33 a	45.38 ± 0.40 a
Dry film (D.O.)	45.58 ± 0.52 a	46.74 ± 0.31 a	45.29 ± 0.44 a
Product (P)			
Control	47.75 ± 0.40 a	47.70 ± 0.60 a	45.95 ± 1.15 a
<i>B. bassiana</i>	45.53 ± 2.78 a	46.63 ± 1.32 a	45.13 ± 1.69 a
<i>M. anisopliae</i>	44.58 ± 3.25 a	46.26 ± 1.52 a	45.35 ± 1.71 a
<i>M. rileyi</i>	45.83 ± 1.39 a	46.66 ± 1.30 a	45.31 ± 1.90 a
(C) concentration			
10 ⁷ con. mL ⁻¹	45.88 ± 0.74 a	46.55 ± 0.44 a	45.25 ± 0.50 a
10 ⁸ con. mL ⁻¹	45.11 ± 0.91 a	46.48 ± 0.43 a	45.28 ± 0.59 a
10 ⁹ con. mL ⁻¹	44.95 ± 0.81 a	46.53 ± 0.44 a	45.26 ± 0.57 a

202 For each factor (application, product or concentration), means followed by letters equal in the same
 203 column do not differ statistically by Tukey test at 5% probability.

204 3.3. Effect of Entomopathogenic Fungi on Predator Behavior

205 It was clear that the *C. externa* larvae were not killed by consuming entomopathogen-infected
 206 *H. armigera* eggs or larvae, at least not within the first several days after consumption (Figure S1A).
 207 However, the *H. armigera* first instar caterpillars exhibited defense mechanisms that prevented the
 208 larvae of *C. externa* from eating them for a period. The larvae were observed to cluster in the area
 209 that was opposite the predator and to produce webs, which, in many cases, allowed them to defend
 210 themselves against predation by *C. externa*. The predator, in turn, remained on the opposite side of
 211 the arena when a caterpillar defense was mounted.

212 The *C. externa* larvae returned to searching for food and capturing prey, preferring to attack the
 213 posterior part of caterpillars and to grab them with their mouthparts (Figure S1 B). Some
 214 caterpillars managed to escape, but many of those were still debilitated by a loss of fluids, owing to
 215 injuries sustained from the attack. The caterpillars remained defensive and mobile in the early
 216 hours of evaluation but later exhibited reduced mobility, which allowed them to be captured
 217 (Figure S1 C).

218 All the *C. externa* larvae reached the pupal stage, with 100% viability in adults.

219
 220

221 4. Discussion

222 The present study makes several useful observations, especially considering the scarcity of
223 information on the potential of *C. externa* as an insect predator of *H. armigera* and on the interactions
224 between *C. externa* and entomopathogenic fungi. The findings of the present study indicate that the
225 interactions between *C. externa* and entomopathogenic fungi are positive because the fungi (*B.*
226 *bassiana*, *M. anisopliae*, and *M. rileyi*) do not interfere with the ability of *C. externa* to consume *H.*
227 *armigera* larvae, assuming that the entomopathogens do not influence the nutritional quality of the
228 prey.

229 Entomopathogenic fungi are a primary source of metabolites and exhibit a variety of
230 antimicrobial, insecticidal and cytotoxic activities [52]. Through chemical communication, these
231 metabolites can be recognized by insects as predators that can reduce feeding by identifying prey
232 infected with hyphae, blastospores after conidiogenesis due to the toxic metabolic action of
233 entomopathogenic fungi [53].

234 This research assumed that *C. externa* consumption was not disrupted when prey were infected
235 by entomopathogenic fungi. However, studies with the predator *Orius insidiosus* (SAY, 1832)
236 (Hemiptera, Anthocoridae) shown that this predator can identify infected aphids and starve to
237 death before consuming the infected prey [54].

238 Even though there was no significant difference between the mean numbers of eggs consumed
239 by third-instar green lacewing, small decreases were noted in the consumption of eggs by *C. externa*
240 at 48–72 h after treatment. This suggests that: (1) the prolonged period of fungal contact with the
241 eggs enabled the germination of the fungus, thereby making the prey unappetizing to the predator,
242 (2) the eggs were more nutritious at this time, owing to the stage of embryo formation, and satiated
243 the predator for a longer period, or (3) the eggs that were exposed to the predator for less time (0–24
244 and 24–48 h) released chemical propionic, benefit during the capture by the *C. externa* larvae.
245 Previous studies have reported that *C. carnea* larvae benefit from the capture of *Helicoverpa zea*
246 (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) by the release of kairomones from eggs and adult scales [55–57].

247 There is a possibility of simultaneous use of entomopathogenic fungi and *C. externa* in the
248 integrated management of lepidopteran pests, since the consumption rates of *C. externa* prey were
249 not reduced by increasing concentrations of entomopathogen suspensions. It has been reported that
250 high concentrations of entomopathogens when applied directly to entomophagous organisms may
251 have a greater negative effect than lower concentrations [25].

252 Fungi act through direct contact and infect a broad spectrum of insect hosts [58]. Both the
253 (D.A.) and (D.F.) methods increase the possibility of contact between insects and fungi in the field.
254 In green lacewings, naked-type larvae have a habit of actively searching for food, moving with the
255 mouthpieces partially open and parallel to the substrate to initiate predation more quickly upon
256 direct contact with prey [59].

257 In the present study, *C. externa* larvae used all of the available space in the arenas, and,
258 consequently, all the larvae came in contact with conidia, regardless of the application method. The
259 dry film method is important because it has the potential to disperse conidia using other
260 entomophagous organisms, as indicated by the recovery of conidia from the insects.

261 Ladybugs (Coccinellidae) and lacewings can naturally spread conidia, with reports that
262 *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) and *C. carnea* disseminated 93 and 89% of
263 *B. bassiana* conidia, respectively, up to 2.4 m away from the site of release, with a positive interaction
264 between infected larvae and aphid consumption.

265 In the present study, the consumption of infected prey and, thus, exposure to
266 entomopathogenic fungi did not affect *C. externa* larval development, pupal development, or adult
267 viability. The quality and quantity of food consumed by the predator during the first larval instars
268 directly influence adult viability, where the highest food intake of lacewings is during the third
269 instar consisting of approximately 72–85% of consumption during the juvenile stages, depending on
270 prey species [49].

271 When larvae *H. armigera* feel threatened by the presence of other insects, they bend with the
272 cephalic capsule towards the ventral region of the first pair of false legs, probably as a defense
273 mechanism. This behavior was noticeable during the approach of the larvae *C. externa*; the
274 caterpillars exhibited cephalic capsule curvature, cobweb production and crowding, with collective
275 defense.

276 These behavioral characteristics may be the result of evolutionary adaptations and population
277 mixing, which makes them more aggressive [2,5,9,60]. The insects can develop defense mechanisms
278 against entomopathogens, predators, and parasitoids, and such mechanisms can include
279 recognition, agglutination, and the activation of proteolytic enzymes, which cause hemolymph
280 coagulation, melanin production, cellular reactions, and the synthesis of antimicrobial peptides and
281 protease inhibitors [61,62].

282 Studies of the interactions between microbial agents and predators are valid because
283 entomopathogenic fungi produce a wide range of pathogenic metabolites and are capable of
284 infecting several orders of insects [63]. According to [64], entomopathogenic fungi may also affect
285 host development, fitness, physiology, and behavior.

286 The compatibility observed in the present study suggests the joint action of *B. bassiana*, *M.*
287 *anisopliae*, *M. rileyi* and *C. externa* in the integrated management of *H. armigera*. It is important to
288 validate the action of natural enemies on lepidopteran-pest eggs, the reduction in the number of
289 pest generations. This study corroborates the results of previous studies in Brazil [30,60] that
290 demonstrated the effectiveness of *C. externa* predation on *H. armigera* eggs and first-instar larvae.

291 Investigated the interactions of entomopathogenic fungi with *C. externa* and consumption
292 capacity of this predator in relation to *H. armigera*, verifying the general predation and compatibility
293 between the tested fungi. We suggest that future studies evaluate the interactions between *C.*
294 *externa* and other microbial agents and investigate the applicability of such microorganisms and
295 entomophages used in the integrated management of lepidopteran pests in important crops.

296 5. Conclusions

297 The consumption of *H. armigera* eggs and first-instar larvae by *C. externa* was not reduced by
298 the application of entomopathogenic fungi (*B. bassiana*, *M. anisopliae*, or *M. rileyi*), regardless of
299 concentration (1×10^7 , 1×10^8 , or 1×10^9 con. mL⁻¹) or application method (DA or DF). *Chrysoperla*
300 *externa* also failed to exhibit discriminatory potential in relation to the contaminated prey at 0, 24, or
301 48 h after inoculation. These findings indicate that there was a positive interaction between the
302 entomopathogenic fungi and the third-instar larvae of *C. externa* and that their simultaneous use
303 may be helpful for controlling *H. armigera* populations. All the *C. externa* larvae reached the pupal
304 stage, with 100% adult viability.

305 **Supplementary Materials:** The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Capture
306 and consumption of first-instar *Helicoverpa armigera* larvae by third-instar *Chrysoperla externa* larvae (time zero).

307 **Author Contributions:** P.M.D. developed the project, designed the experiment, collected and analyzed the
308 data, and wrote the manuscript. E.d.S.L. helped, guided, and oversaw the writing of the project, designed the
309 experiment, provided funds for the purchase of materials, and reviewed the manuscript. L.G.A.P. helped
310 develop the project, provided necessary laboratory materials, and reviewed the manuscript. F.M.d.O.N. and
311 R.A.d.S.T. designed and evaluated the experiment. P.E.T. helped analyze and interpret the data and revised the
312 manuscript.

313 **Funding:** This research was funded by (FUNDECT) - Foundation to Support the Development of Education,
314 Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul, MS, Brazil, grant number (59/300.513/2016).

315 **Acknowledgments:** We are grateful to the Graduate Program in Entomologia e Conservação da
316 Biodiversidade, (PPGECB-UFGD) (Dourados, MS, Brazil); for the resources, it offered to help publish this
317 manuscript; (FUNDECT), Foundation to Support the Development of Education, Science and Technology of
318 the State of Mato Grosso do Sul for granting the doctoral scholarship to the first author, the Universidade
319 Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS campus of Chapadão do Sul, for providing space to perform the

320 experiment at the Laboratory of Entomology; and members of the LAMIP research group and trainees of
321 UEMS-UCC (Cassilândia, MS, Brazil) for their collaboration in the course of the bioassay.

322 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

323 References

- 324 1 Pomari-Fernandes, A.; Bueno, A.F.; Sosa-Gómez, D.R. *Helicoverpa armigera*: Current status and future
325 prospects in Brazil. *Curr. Agric. Sci. Technol.* **2015**, *21*, 1–7.
- 326 2 Czepak, C.; Albernaz, K.C.; Vivan, L.M.; Guimarães, H.O.; Carvalhais, T. First record of occurrence of
327 *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesqui. Agropecu. Trop.* **2013**, *43*, 110–113,
328 doi:10.1023/S198340632013000100015.
- 329 3 Drake, V.A. Methods for studying adult movement in heliothis. In *Heliothis: Research Methods and*
330 *Prospects*; Zalucki Myron, P., Ed.; Elsevier: New York, NY, USA, 1991; pp. 109–121.
- 331 4 Wang, C.N.; Li, Z.H. Studies on the biology of the cotan earworm *Heliothis armigera* (Hübner) and abacco
332 earworm *Heliothis assulta* (Quenee). *J. Shandong Agric. Univ.* **1984**, *1*, 13–25.
- 333 5 Ávila, J.C.; Vivian, L.M.; Amquelski, G.V. *Occurrence, Biological Aspects, Damage and Management Strategies*
334 *of Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Agricultural Production Systems; Embrapa
335 Agropecuária Oeste: Dourados, Brazil, 2013; p. 12. (Emprapa Agropecuária Oeste. Circular Technique,
336 23).
- 337 6 Sarwar, M.M.; Ahmad, N.; Aufiq, M. Host plant resistance relation ships in chickpea (*Cicer arietinum* L.)
338 against gram pod borer *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Pak. J. Bot.* **2009**, *41*, 3047–3052.
- 339 7 Pratisoli, D.; Lima, V.L.; Pirovani, V.D.; Lima, W.L. Ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:
340 Noctuidae) em tomateiro no estado do Espírito Santo. *Hortic. Bras.* **2015**, *33*, 101–105. (In Portuguese)
- 341 8 Suzana, C.S.; Damiani, R.; Fortuna, L.S.; Salvadori, J.R. Performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner)
342 (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on different food sources. *Pesq. Agropecu. Trop.* **2015**, *45*, 480–485.
- 343 9 Silva, I.F.; Baldin, E.L.L.; Specht, A.; Sosa-Gómez, D.R.; Roque-Specht, V.F.; Morando, R.; Paula-Moraes,
344 S.V. The biotic potential and Life Table of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from
345 three Brazilian Regions. *Neotrop. Entomol.* **2018**, *47*, 344–351.
- 346 10 Michigan State University. Arthropod Pesticide Resistance Database. Available online:
347 <http://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=41> (accessed on 3 April 2019).
- 348 11 Fathipour, Y.; Sedaratian, A. Integrated management systems of cultivation of soy *Helicoverpa armigerain*.
349 In *Resistance a Pests of Soybeans*; Elshemy, H.A., Ed.; InTeOpP: Cairo, Egypt, 2013; pp. 231–280.
- 350 12 De Bueno, A.F.; Hirose, E.; Sosa-Gómez, D.R.; Hoffmann-Campo, C.B.; Roggia, S. *Folder-Helicoverpa*
351 *Armigera and Other Challenges of Pest Management in Soybean Crop*; Embrapa Soja: Londrina, Brazil, 2013.
352 Available online: [http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90797/1/folder-helicoverpa-](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90797/1/folder-helicoverpa-baixa.pdf)
353 [baixa.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90797/1/folder-helicoverpa-baixa.pdf) (accessed on 1 April 2019).
- 354 13 Wang, Z.Y.; He, K.L.; Zhan, F.; Lu, X.; Babendreier, D. Mass rearing and release of *Trichogramma* for
355 biological control of insect pests of maize in China. *Biol. Control* **2013**, *68*, 136–144.
- 356 14 De Bueno, A.F.; Carvalho, G.A.; dos Santos, A.C.; Sosa-Gómez, D.R.; Silva, D.M.D. Pesticide selectivity to
357 natural enemies: Challenges and consisoladots for research and field recommendation. *Ciência Rural* **2017**,
358 *47*, 1–10.
- 359 15 Ignoffo, C.M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In *Microbial Control of Pests and Plant*
360 *Diseases: 1970–1980*; Burgers, H.D., Ed.; Academic Press: London, UK, 1981; p. 949.
- 361 16 Alves, S.B.; Lopes, R.B. *Microbial Control of Pests in Latin America*; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 2008; p. 414.
- 362 17 Kalvnadi, E.; Mirmoayedi, A.; Alizadeh, M.; Pourian, H.R. Sublethal concentrations of the
363 entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, increase the costs of physical conditioning of pups of
364 *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, *158*, 32–42.
- 365 18 Wang, C.; St Leger, R.J. The collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* a evade insect
366 immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6647–6652.
- 367 19 Devi, P.S.S.; Prasad, Y.F.; Chowdary, D.A.; Rao, L.M.; Balakrishnan, K. Identification of virulent isolates
368 of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson is the management of *Helicoverpa armigera*
369 and *Spodoptera litura*. *Mycopathologia* **2003**, *56*, 365–373.

- 370 20 Tang, G.; Hou, R. Effects of environmental factors on the virulence of the entomopathogenic fungus
371 *Nomuraea rileyi*, against the ear of corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep. Noctuidae). *J. Appl. Entomol.*
372 **2001**, *125*, 243–248.
- 373 21 Costa, V.H.D.; Soares, A.M.; Rodriguez, F.A.D.; Zanoncio, J.C.; Silva, I.M.; Valicente, F.H. *Nomuraea rileyi*
374 (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. *Flo.*
375 *Entomol.* **2015**, *980*, 796–798.
- 376 22 Sujii, E.; Carvalho, V.; Tigano, E. Sporulation kinetics and conidial viability of *Nomuraea rileyi* (Farlow)
377 samson on cadavers of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae),
378 in field conditions. *Neotrop. Entomol.* **2002**, *31*, 85–90.
- 379 23 Maia, W.J.M.S.; Carvalho, C.F.; Souza, B.; Cruz, I.; Maia, T.J.A.F. *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856)
380 (Hemiptera: Aphididae). *Ciência Agrotecnologia* **2004**, *28*, 1259–1268.
- 381 24 Lacey, L.A.; Fruits, R.; Kaya, H.K.; Vail, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a
382 future? *Biol. Control* **2001**, *21*, 230–248.
- 383 25 Portilla, M.; Luttrell, R.; Snodgrass, G.; Zhu, Y.C.; Riddick, E. Lethality of the entomopathogenic fungus
384 *Beauveria bassiana* NI8 isolado in *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and its possible impact on beneficial
385 arthropods. *J. Entomol. Sci.* **2017**, *52*, 352–369.
- 386 26 Generoso, A.R. Compatibility of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* with *Chrysoperla externa*
387 (Neuroptera: Chrysopidae) and Methodology for Evaluating Selectivity. Master's Thesis (Master in
388 Entomology), Paulista State University, Jaboticabal-SP, Brazil, 2002; p. 63.
- 389 27 Pessoa, L.G.A.; Cavalcanti, R.S.; Moino Junior, A.; Souza, B. Compatibility between *Beauveria bassiana* and
390 predator *Chrysoperla externa* in the laboratory. *Pesq. Agropecu. Bras.* **2005**, *40*, 617–619.
- 391 28 Cardoso, E.R.; Freitas, S.; Nunes, H.T.; Pessoa, L.G.A. Selectivity of *Lecanicillium lecanii* and *Metarhizium*
392 *anisopliae* for first instar larvae of *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory. *Acta Sci.*
393 *Agron.* **2007**, *29*, 563–568.
- 394 29 Schilick, E.C.; Toscano, L.C.; Souza, G.D.; Peres, A.J.A.; Dias, P.M.; Maryama, W.I. Compatibility of
395 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) with *Chrysoperla externa*
396 (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *EntomoBrasilis* **2015**, *8*, 189–195.
- 397 30 Albuquerque, D.F.A.; Cruz, I. Biological Aspects of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera:
398 Chrysopidae) having as a source of food eggs of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).
399 Seminar on Scientific Initiation Program PIBIC/BIC JÚNIOR, 2017, Sete Lagoas (submitted paper). In
400 Proceedings of the Sete Lagoas: Embrapa Maize and Sorghum, *Sete Lagoas*, Brazil, 17 August 2017.
401 Available online: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1074573>> (accessed on 10 April
402 2019).
- 403 31 Bortoli, S.A.; Caetano, A.C.; Murata, A.T.; Oliveira, J.E.M. Development and predatory ability of
404 *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) in different prey. *Bioterra* **2006**, *6*, 154–152.
- 405 32 Murata, T.; Caetano, C.; Bortoli, S.A.; Brito, C.H. Capacity of consumption of *Chrysoperla externa* (Hagen,
406 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) in different prey. *Rev. Caatinga* **2006**, *19*, 304–309.
- 407 33 Pessoa, L.G.A.; Freitas, S.; Loureiro, E.S. Post-embryonic development of *Ceraeochrysa cincta* (Schneider,
408 1851) (Neuroptera: Chrysopidae) fed on eggs of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
409 Crambidae). *Semin. Ciênc. Agrár.* **2010**, *31* (Suppl. 1), 1355–1360.
- 410 34 Bezerra, C.E.S.; Nogueira, C.A.F.; Shadow, M.C.D.S.; Demartelaere, A.C.C.; Araujo, E.L. Green lacewings
411 (Neuroptera: Chrysopidae): Biological Aspects, potential use and future perspectives. *Rev. Caatinga* **2009**,
412 *22*, 1–5.
- 413 35 González-Mas, N.; Cuenca-Medina, M.; Gutiérrez-Sánchez, F.; Quesada-Moraga, E. Botam-up effects of
414 *Beauveria bassiana* endophytes in interactions between multitróficas the cotan aphid, *Aphis gossypii* and its
415 natural enemies in melon. *J. Pest. Sci.* **2019**, *92*, 1271–1281.
- 416 36 Canassa, F.; Tall, S.; Moral, R.A.; Lara, I.A.R.; Magali, I., Jr.; Meyling, N.V. Effects of bean seed treatment
417 by the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite
418 populations and behavior of predatory mites. *Biol. Control* **2019**, *132*, 199–208.
- 419 37 Zhu, H.; Kim, J. Dissemination of *Beauveria bassiana* conidia oriented toward the target by predators
420 *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) for
421 biocontrol of *Myzus persicae*. *Biocontrol Sci. Technol.* **2012**, *4*, 393–406.

- 422 38 Ríos-Moreno, A.; Quesada-Moraga, E.; Garrido-Jurado, I. Treatments with isolados of *Metarhizium*
423 *brunneum* BIPESCO5 and EAMa01/58-Su (Ascomycota: Hypocreales) are of low risk a the generalist
424 predator *Chrysoperla carnea*. *J. Pest. Sci.* **2017**, *91*, 385–394.
- 425 39 Greene, G.L.; Leppla, N.C.; Dickerson, W.A. Velvet bean caterpillar: The rearing procedure artificial
426 medium. *J. Econ. Entomol.* **1976**, *69*, 487–488.
- 427 40 Pinóia, S.F. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) and Spinosad in Combating the *Helicoverpa armigera*
428 (crystalline) (Lepidoptera: Noctuidae) in Amaa. Master's Thesis (Masters in Agronomic Engineering),
429 Intitua Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2012; p. 89. (In
430 Portuguese)
- 431 41 Rodríguez, H.C.; Vendramim, J.D. Use of nutritional indices a measure el efeca insectistatico extracts of
432 meliaceae on *Spodoptera frugiperda*. *Man. Int. Plagas* **1998**, *48*, 11–18.
- 433 42 Freitas, S. *Chrysoperla* Steinmann, 1964 (Neuroptera: Chrysopidae): Description of a new species from
434 Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* **2003**, *47*, 385–387.
- 435 43 Ribeiro, M.J. Biology of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera, Chrysopidae) Fed with Different
436 Diets. Master's Thesis (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG,
437 Brazil, 1988.
- 438 44 Dias, P.M.; Almeida Filho, L.M.; Pessoa, L.G.A.; Loureiro, E.S.; Ramalho, K.F. Production of *Metarhizium*
439 *Rileyi* in Different Mixtures of Rice and Sorghum in XII Agronomic Week Cassilândia & V week of
440 Research of the Post-graduation. In Proceedings of the V Week of Postgraduate Research, Cassilândia,
441 Brazil, 21 March 2017; p. 99.
- 442 45 Rossoni, C.; Kassab, S.O.; Loureiro, E.S.; Pereira, F.; Costa, D.P.; Barbosa, R.H.; Zannuncio, J.C. *Metarhizium*
443 *anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes*
444 (Hymenoptera: Braconidae). *Fla. Entomol.* **2014**, *97*, 1794–1804.
- 445 46 Thungrabeab, M.; Angma, S. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (BALSAM) and
446 *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non-target insects. *KMITL Sci. Technol. J.* **2007**, *7*, 1.
- 447 47 Hassan, S.A. Standard methods a test the Sideeffects of pesticides on natural enemies of insects and mites
448 developed by the IOBC/WPRS Wprk Group 'Pesticides and Beneficial Organisms". *EPPO Bull.* **1985**, *15*,
449 214–255.
- 450 48 Hassan, S.A. Standardized techniques for testing side-effects of pesticides on beneficial arthropods in the
451 laboratory. *Zeitschrift für Pflanz. Pflanzenschutz* **1977**, *84*, 158–163.
- 452 49 Albuquerque, S.A. Green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). In *The Bioecology and Nutrition of Insects:*
453 *Basis for the Integrated Management of Pests*, 1st ed.; Panizzi, A.R., Parra, J.R.P., Eds.; Embrapa
454 Technological Information: Brasilia, Brazil, 2009; Volume 23, pp. 969–1022.
- 455 50 Bhering, L.L. Rbio: A Tool for Biometric and Statistical Analysis Using the R Platform. *Crop Breed. Appl.*
456 *Biotechnol.* **2017**, *17*, 187–190.
- 457 51 Cruz, C.D. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci.* **2016**, *38*,
458 547–552.
- 459 52 Gibson, D.M.; Donzelli, B.M.G.; Krasnoff, S.B.; Keyhani, N.J. Discovering the secondary metabolite
460 potential encoded within entomopathogenic fungi. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1287–1305.
- 461 53 Cohen, A.C. How carnivorous bugs feed. In *Heteroptera of Economic Importance*; Schaefer, C.W., Panizzi,
462 A.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2000; p. 828.
- 463 54 Loureiro, E.S.; Moino Júnior, A. Consumption of *Aphis gossypii* Glover, 1877 and *Myzus persicae* (Sulzer,
464 1776) infected with entomopathogenic fungi by *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera, Anthocoridae).
465 *Arq. Inst. Biol.* **2008**, *75*, 497–504.
- 466 55 Kawecki, Z. Beobachtungen über das verhalten und die sinnesorientierung der florfliegenlarven. *Bull. Int.*
467 *Acad. Pol. Sci. Lett. Crac.* **1932**, *2*, 91–106.
- 468 56 Lewis, J.; Norlund, D.A.; Gross Junior, H.R.; Jones, R.L.; Jones, S.L. Kairomones and their use for
469 management of entomophagous insects V: Moth scales as a stimulus for predation of *Heliothis zea*
470 (Boddie) eggs by *Chrysopa carnea* Stephens larvae. *J. Chem. Ecol.* **1977**, *3*, 483–487.
- 471 57 Norlund, D.A.; Lewis, W.J.; Jones, R.L.; Gross Junior, H.R.; Hagen, K.S. Kairomones and their use for
472 management of entomophagous insects VI: An examination of the Kairomones is the predator *Chrysopa*
473 *carnea* STEPH. at the Avaliados sites of *Heliothis zea* (Boddie). *J. Chem. Ecol.* **1977**, *3*, 507–511.

- 474 58 Alves, S.B.; Milk, L.H.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Marques, E.J. Massal production of
475 entomopathogenic fungi in Latin America. In *Microbial Control of Pests in Latin America*, 2nd ed.; Alves,
476 S.B., Lopes, R.B., Eds.; FEALQ: Peicaba, Brazil, 2008; pp. 215–237.
- 477 59 Canard, M.; Duelli, P. Predatory behavior of larvae and cannibalism. In *Biology of the Chrysopidae*; Canard,
478 M., Séméria, Y., New, T.R., Eds.; Dr. W. Junk Publishers: The Hague, The Netherlands, 1984; Volume 27,
479 pp. 92–100.
- 480 60 Oliveira Neto, F.M.; Dias, P.M.; Loureiro, E.S.L.; Pessoa, L.G.A.; Silva, J.X.; Devoz, G.L.R.; Bellanda,
481 M.E.R.S. Behavior of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:
482 Noctuidae). In Proceedings of the Annual Meeting of the SBPC, UFMS, Campo Grande/MS, Brazil, 21–27
483 July 2019.
- 484 61 Wheeler, M.B.; Stuart, G.; Hapner, M.C.D. Agglutinin mediated opsonization of fungal blasaspores in
485 melanoplus differentialis (Insecta). *J. Insect Physiol.* **1993**, *39*, 477–483.
- 486 62 Wilson, R.; Chen, C.; Albany Adult, N.A. Innate immunity in insects—the role of multiple endogenous
487 serum lectin in the recogition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus Discoidalis*. *J. Immunol.* **1999**,
488 *162*, 1590–1596.
- 489 63 Roberts, D.W. Axins of entomopathogenic fungi. In *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970–1980*,
490 1st ed.; Burges, H.D., Ed.; Academic Press: London, UK, 1981; pp. 441–463.
- 491 64 Gurung, K.; Wertheim, B.; Salles, J.F. The microbiome of pest insects: It is not just bacteria. *Entomol. Exp.*
492 *Appl.* **2019**, *167*, 156–170.

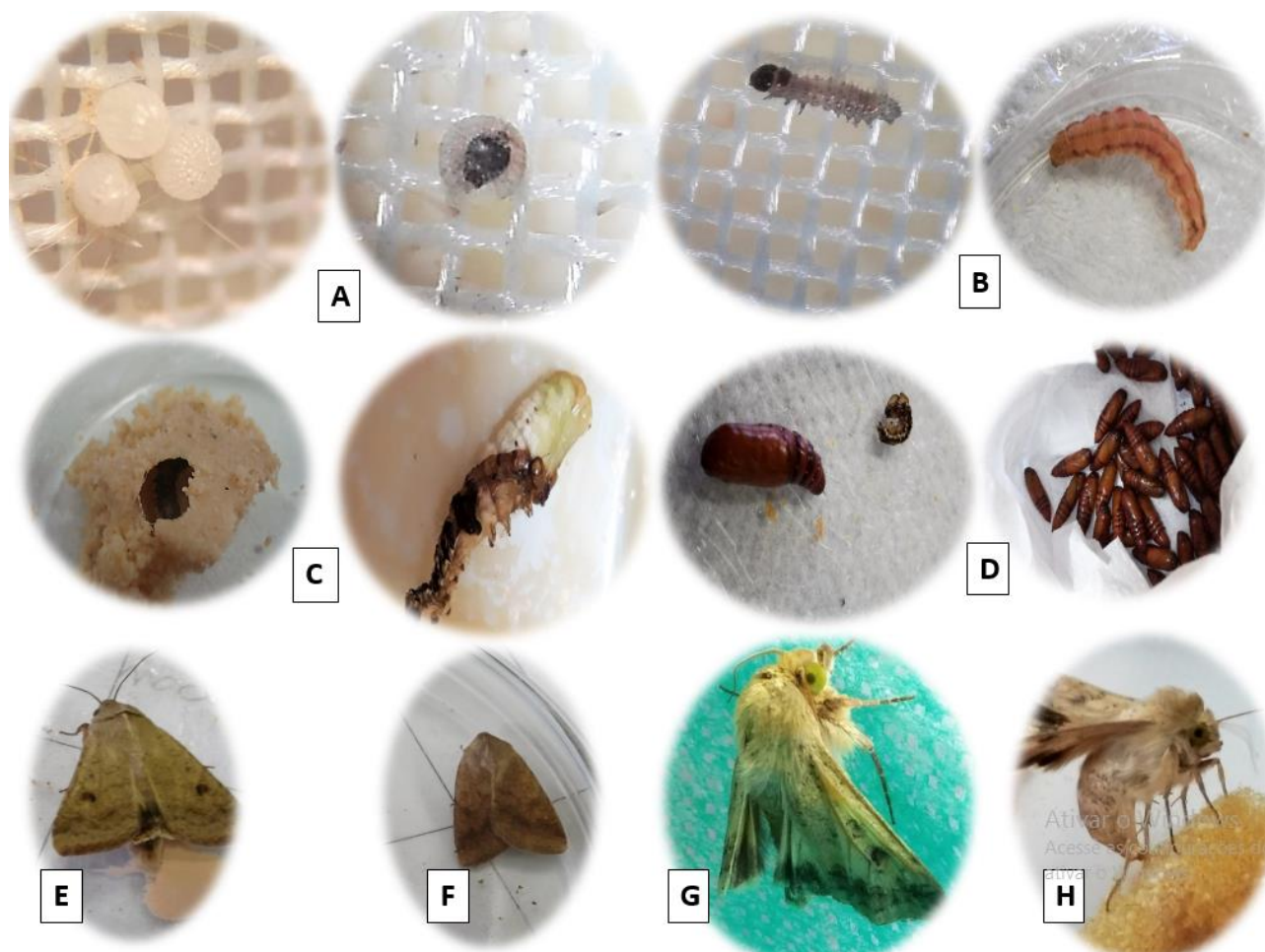


© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

493
494
495
496
497
498
499

ANEXOS

ANEXO 1. Ciclo biológico de *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em criação massiva em laboratório.

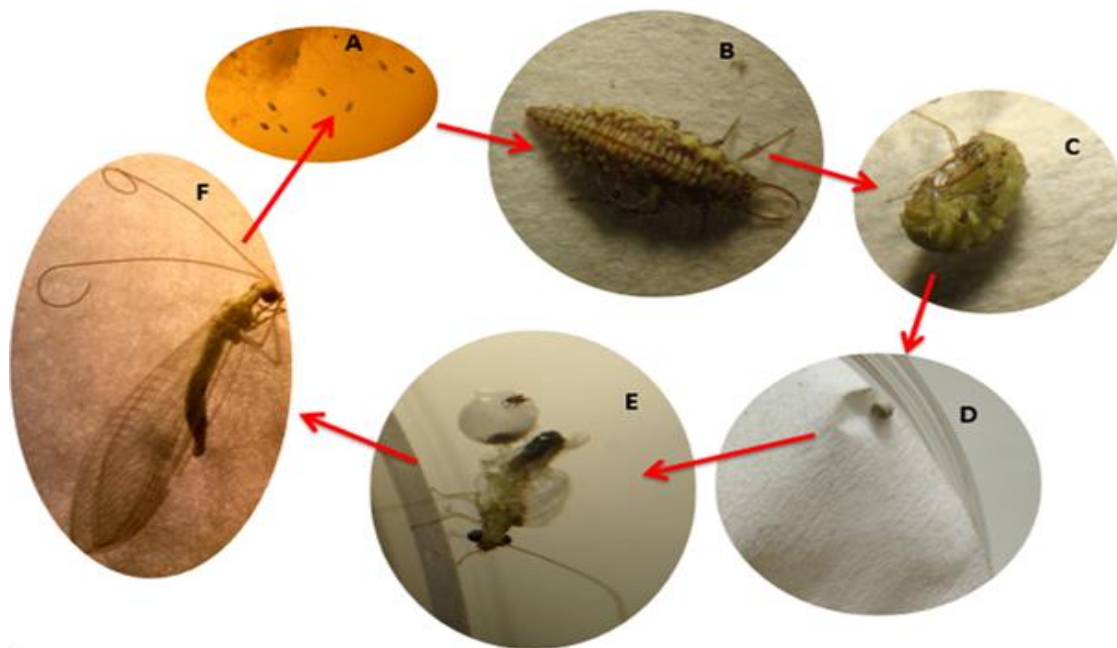


Fonte: Pamella Mingotti Dias (2019)

A-Postura de *H. armigera*, ovos com (< 24 h), e ovo com 3 dias de postura, em evidência a coloração escura da cabeça da lagarta, próximo da eclosão; **B-** Lagarta neonata e lagarta de 5^o instar; **C-** Pré-pupa alocada dentro da dieta artificial, próximo a empupação e pupa em formação, com coloração verde claro e última ecdise; **D-** Pupas formadas de coloração marrom escuro, com evidência da última ecdise no substrato. **E-** Mariposa macho; **F-** Mariposa fêmea; **G-** Macho após a cópula; **H-** Fêmea efetuando a oviposição. (Imagens registradas com auxílio de camera de 13 Mpx).

ANEXO 2. Ciclo biológico de *C. externa* (Neuroptera: Chrysopidae) em criação massiva em laboratório.

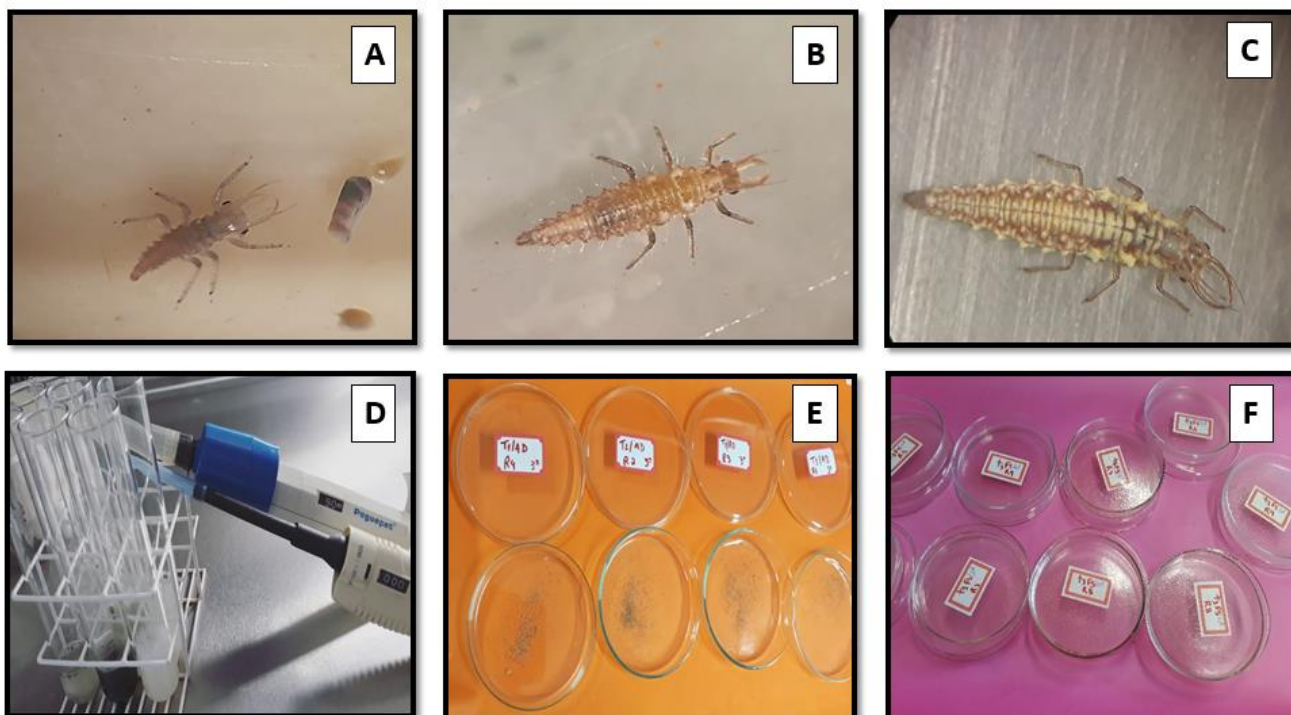
Fonte: Pamela Mingotti Dias (2019).



A-Postura de *C. externa*, em evidência ovos com pedicelo; **B-** Larva de 3º instar de *C. externa* **C-** Pré-pupa **D-** Pupa; **E-** Emergência e abertura das asas; **F-** Adulto de *C. externa*.(Imagens registradas com auxílio de camera de 13 Mpx).

Material Suplementar capítulo II

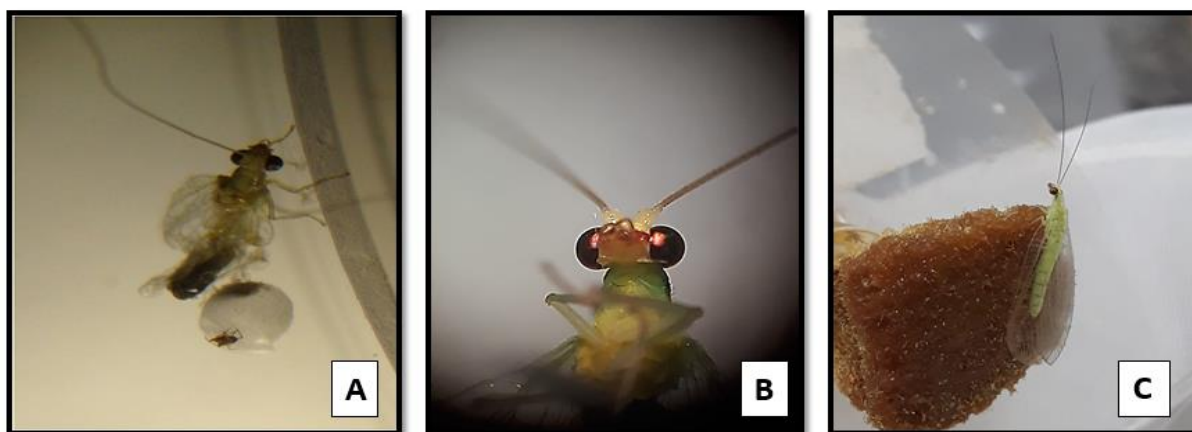
ANEXO 3. Figure S1- Bioassay of virulence of entomopathogens on the larval stage of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae).



A- first instar of *Chrysoperla externa*; **B-** second instar of *Chrysoperla externa*; **C-** third instar of *Chrysoperla externa*; **D-** original suspensions of *Beauveria bassiana* (isolado ESALQ PL63); T3: *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ E9); T4: *Metarhizium rileyi* (isolado UFMS 03; **E-** methodology of application: direct application (D.A.); **F-** methodology of application: the application dry film (D.F.). (Images recorded with 13 Mpx camera. Surfboard (A, B and C), with the aid of a stereoscopic microscope with an increase of 20 X).

ANEXO 4. Figure S2- Emergence of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), after application of treatments on third instar larvae.

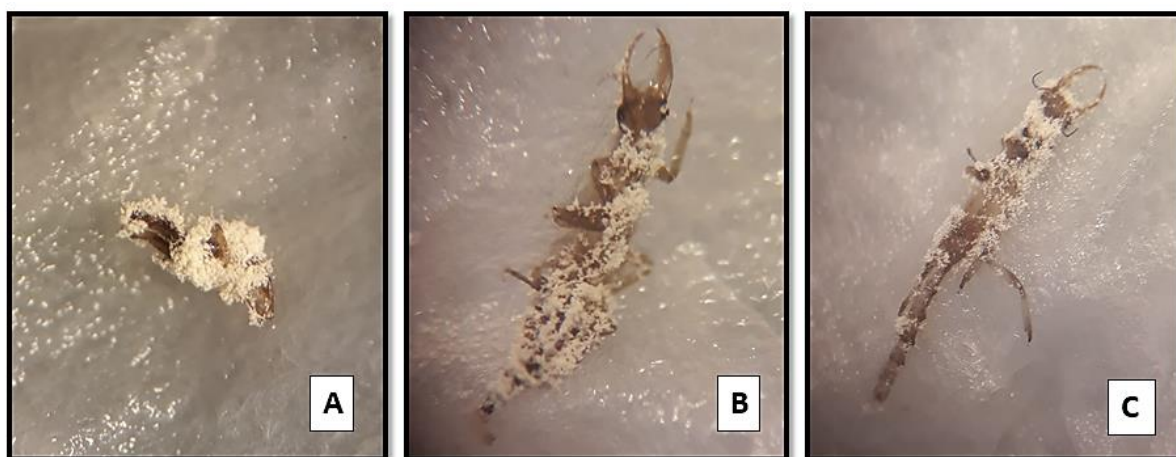
Fonte: Pamella Mingotti Dias (2019)



A- The emergence of *C. externa*, treatment with *B. bassiana* (1×10^9 con.mL⁻¹) (D.O.); **B-** Imago of *C. externa*, treatment with *M. anisopliae* (1×10^9 with.mL⁻¹) (D.F.), highlighted the antennae and the golden eyes, characteristic of the group green lacewing; **C-** adults of *C. externa*, regular size, control treatment (D.A.). (Images recorded with 13 Mpx camera. With the aid of a stereoscopic microscope with an increase of 20 X).

ANEXO 5. Figure S3- Conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (isolado ESALQ PL63), on cadavers of *Chrysoperla externa* with mortality 120 hours after application.

Fonte: Pamella Mingotti Dias (2019)

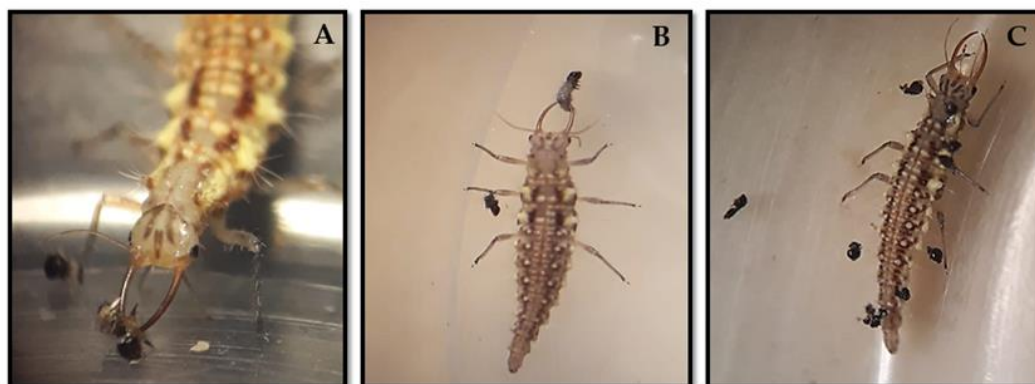


A- confirmed mortality by the fungus *Beauveria bassiana* (1×10^7 con.mL⁻¹), (D.A.), on dead bodies of second instar of *Chrysoperla externa*, 5 days after mortality; **B-** Conidiogenesis on third instar larvae, 3 days after the death (1×10^8 con.mL⁻¹), (D.O.); **C-** conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (1×10^9 con.mL⁻¹), (D.A.), on dead bodies of third instar, 3 days after death. (Images recorded with 13 Mpx camera. With the aid of a stereoscopic microscope with an increase of 20 X).

Material Suplmentar capítulo III

ANEXO 6. Figure S1. Capture and consumption of first-instar *Helicoverpa armigera* larvae by third-instar *Chrysoperla externa* larvae (time zero).

Fonte: Pamella Mingotti Dias (2019)



A-catch and suction of cellular fluid of caterpillars with 2 hours of evaluation; **B**- Capture of larvae by the final portion of the abdomen with a period of 6 hours of evaluation; **C**- cephalic capsules of caterpillars ingested by the green lacewing during 24 hours of evaluation. (Photos registered with 13 Mpx camera and aid of stereoscopic microscope with an increase of 20 X).