



ANA CARLA DA SILVA SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium* ENTOMOPATOGÊNICOS
AOS EXTRATOS DE *Caesalpinia pyramidalis* E *Ricinus communis* VISANDO O
CONTROLE DE *Dactylopius opuntiae* EM *Opuntia ficus-indica***

**RECIFE
FEVEREIRO/2015**



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

**ASSOCIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium* ENTOMOPATOGÊNICOS
AOS EXTRATOS DE *Caesalpinia pyramidalis* E *Ricinus communis* VISANDO O
CONTROLE DE *Dactylopius opuntiae* EM *Opuntia ficus-indica***

**ANA CARLA DA SILVA
SANTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Dra. Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Patricia Vieira Tiago

**RECIFE
FEVEREIRO/2015**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Ana Carla da Silva

Associação de isolados de *Fusarium* entomopatogênicos aos extratos de *Caesalpinia pyramidalis* e *Ricinus communis* visando o controle de *Dactylopius opuntiae* em *Opuntia ficus-indica* Ana Carla da Silva Santos– Recife: O Autor, 2015.

62 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadora: Patrícia Vieira Tiago

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Pragas- controle biológico 2. Fungos entomopatogênicos 3. *Fusarium* I. Oliveira, Neiva Tinti de (orientadora) II. Tiago, Patrícia Vieira (coorientadora) III. Título**

628.97

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-139

**ASSOCIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium* ENTOMOPATOGÊNICOS
AOS EXTRATOS DE *Caesalpinia pyramidalis* E *Ricinus communis* VISANDO O
CONTROLE DE *Dactylopius opuntiae* EM *Opuntia ficus-indica***

ANA CARLA DA SILVA SANTOS

Data da defesa: 26/02/2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Félix da Costa
Instituto Agrônomo de Pernambuco

Dra. Virginia Michelle Svedese
Universidade Federal do Vale do São Francisco

“É o amor que nos acolhe, nos desperta e nos leva adiante no movimento pleno e grandioso da vida.”

André J. Gomes.

Agradecimentos

A Deus pelo amor, pela vida, pela família e pelas bênçãos e oportunidades a mim concedidas.

A toda a minha família que sempre me incentivou a acreditar em meus sonhos, em especial a meus pais Carlos Leandro e Maria Lúcia, meus amores, que me apoiaram com grande entusiasmo em todas as jornadas da minha vida.

A Marlus Filipe, meu amado, pelo companheirismo, apoio e amor a mim dedicados.

Às minhas orientadoras Neiva Tinti de Oliveira e Patricia Vieira Tiago, pelo suporte, amizade e confiança, além dos valiosos ensinamentos prestados.

À minha turma de mestrado, pelo carinho, risadas e angústias compartilhadas.

Aos amigos do Departamento de Micologia, em especial aos parceiros do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos (Renan, Rafael, Felipe, Amanda, Bruna, Bárbara, Ivana, Myrella, Ewerton, Alexandre, Henrique, Susane, Sérgio, Bruno, Isabela e Professor Sidney Turyassú) pela convivência e ajuda que tornaram o dia-a-dia mais agradável.

Ao pesquisador e amigo Antônio Félix da Costa, que compreendeu a importância deste trabalho e viabilizou o apoio necessário para a sua realização.

À Mariele Porto, pela solicitude e suporte na biologia molecular.

À equipe do IPA, com a qual dei os primeiros passos na Micologia, pelo carinho, torcida e ensinamentos. Luciana Gonçalves, Rosineide Lopes, Geiziqueli de Lima, Agatha Rocha, Dandara Wenne, Lílian Medeiros, Conceição Martiniano.

A todos os bons professores que tive desde o início da jornada de estudos, os quais desenvolvem o valioso papel de despertar vocações nos alunos.

À Universidade Federal de Pernambuco, mais especificamente ao Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, que foi o meu local de aprendizagem ao longo do mestrado.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), cuja parceria foi de grande importância para o desenvolvimento do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento do trabalho.

Sinto-me agradecida por todas as oportunidades e experiências vividas, e a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica.

RESUMO GERAL

No Nordeste Brasileiro, a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é uma das principais espécies destinadas à alimentação de rebanhos animais, desempenhando importante papel econômico e social nas regiões áridas e semiáridas da região. A produtividade da cultura tem sido severamente ameaçada pelo ataque da cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*), sendo necessário investir em métodos que promovam o controle dessa praga. O controle de insetos por meio de fungos entomopatogênicos e extratos vegetais tem se mostrado eficiente e menos prejudicial à saúde das pessoas e dos ecossistemas. Alguns estudos indicam que esses métodos, quando utilizados em conjunto, podem ter sua ação inseticida potencializada. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a compatibilidade entre extratos de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) e mamona (*Ricinus communis*) e isolados de *Fusarium* obtidos da cochonilha do carmim, visando a possibilidade de empregá-los juntos no controle do inseto; avaliar o efeito inseticida desses separadamente e em combinação contra a cochonilha do carmim em palma forrageira e confirmar a identidade dos isolados de *Fusarium* por meio do sequenciamento das regiões β -tubulina e TEF-1 α do DNA. A identificação molecular revelou que os isolados de *Fusarium* utilizados pertencem ao Complexo de Espécies *F. incarnatum-equiseti*. De acordo com os resultados obtidos nos testes de compatibilidade, os isolados URM6776 e URM6778 associados aos extratos aquoso e hidroetanólico de *R. communis* nas concentrações de 5% e 10%, respectivamente, foram os mais indicados para estudo contra *D. opuntiae*. Para o extrato aquoso de *C. pyramidalis*, selecionou-se a concentração de 10% e os isolados URM6776 e URM6777, e para o extrato hidroetanólico, a concentração de 10% e os isolados URM6777 e URM6782. Quanto aos testes contra a cochonilha, bons valores de mortalidade corrigida foram observados para todos os tratamentos, variando de 61.23% (extrato de mamona aquoso a 5%) a 100% (Isolado URM6778 + extrato de mamona aquoso a 5%), tratamento que se revelou, em laboratório, o mais eficiente para o controle de *D. opuntiae*. Estudos com o intuito de testar a eficiência desses tratamentos em condições de campo, e de fornecer respostas quanto à segurança do uso dos mesmos devem ser conduzidos, visando disponibilizar alternativa eficiente para o controle da praga e não prejudicial ao ambiente e à saúde do produtor familiar e de sua criação.

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti*, extratos vegetais.

ABSTRACT

In the Brazilian Northeast, the cactus *Opuntia ficus-indica* is a key species for feeding livestock, playing an important economic and social role in the arid and semi-arid areas of the region. The crop productivity has been severely threatened by the attack of cochineal *Dactylopius opuntiae*, being necessary to invest in methods to promote the control of the pest. The insect control using entomopathogenic fungi and plant extracts has been showing efficient and less harmful to human health and ecosystems. Some studies indicate that these methods, when used together, can have their insecticidal action strengthened. This study aimed to evaluate the compatibility among extracts of *Caesalpinia pyramidalis* e *Ricinnus communis* and isolates of *Fusarium* obtained from *D. opuntiae*, aiming to the possibility of use them together in insect control; to evaluate the insecticidal effect of these separately and in combination on *D. opuntiae* in *O. ficus-indica* and to confirm the identity of isolates of *Fusarium* by means of the sequencing of β -tubulin and TEF-1 α regions of DNA. The molecular identification showed that the *Fusarium* isolates used belong to the species-complex *F. incarnatum-equiseti*. According the results obtained in compatibility testing, the URM6776 and URM6778 isolates combined with aqueous and hydroethanol extracts of *R. communis* in concentrations of 5% and 10%, respectively, were the most suitable for study against *D. opuntiae*. To the aqueous extract of *C. pyramidalis* was selected concentration of 10% and URM6776 and URM6777 isolates, and to the hydroethanolic extract the concentration of 10% and URM6777 and URM6782 isolados. Regarding tests against cochineal, good corrected mortality values were obtained in all treatments, ranging from 61.23% (extracts aqueous of *R. communis* 5%) to 100% (isolated URM6778 + extracts aqueous of *R. communis* 5%) treatment that was revealed, under laboratory conditions, the most efficient in the control of *D. opuntiae*. Studies with the aim of test the effectiveness of these treatments under field conditions, and provide answers about the safety of their use should be conducted, with the purpose of provide efficient alternative to pest control and not harmful to the environment and to the health of family farmer and his breeding.

Key-words: biological control, entomopathogenic fungi, *F. incarnatum-equiseti* species complex, vegetable extracts.

Lista de abreviaturas

FAO	Food and Agriculture Organization
FIESC	Complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>
IB	Índice Biológico
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
MPA	Movimento dos Pequenos Agricultores
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
TEF-1 α	Gene do fator de alongamento de tradução 1 α

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 – Fases biológicas da fêmea de <i>Dactylopius opuntiae</i> . A: ovos. B: ninfa. C: fêmea adulta.....	18
Figura 2 – Criação de <i>Dactylopius opuntiae</i> sobre <i>Opuntia ficus-indica</i> em casa de vegetação do Instituto Agronômico de Pernambuco.....	36
Figura 3 – Adultos de <i>Dactylopius opuntiae</i> sobre a palma forrageira, visualizados com estereomicroscópio. A: Inseto: controle. B: Inseto: tratamento fungo + extrato.....	37
Figura 4 - Insetos mortos de <i>Dactylopius opuntiae</i> sobre a palma forrageira no tratamento Isolado URM6778 + Extrato aquoso de mamona a 5%, visualizados com estereomicroscópio.....	47

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 - Identificação dos isolados de <i>Fusarium</i> , segundo O'Donnell <i>et al.</i> (2009), após o sequenciamento das regiões TEF-1 α e β -tubulina do DNA, comparadas com o Banco de Dados Fusarium-ID.....	38
Tabela 2 - Diâmetro das colônias, número de esporos/cm ² e porcentagem de esporos viáveis (média \pm E.P.), produzidos por isolados de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato aquoso de mamona. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.....	41
Tabela 3 - Diâmetro das colônias, número de esporos/cm ² e porcentagem de esporos viáveis (média \pm E.P.), produzidos por isolados de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de mamona. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.....	41
Tabela 4 – Classificação da compatibilidade dos isolados de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) com os extratos aquoso e hidroetanólico de mamona e catingueira, em diferentes concentrações (valor IB, segundo Rossi-Zalaf <i>et al.</i> , 2008).....	43
Tabela 5 - Diâmetro das colônias, número de esporos/cm ² e porcentagem de esporos viáveis (média \pm E.P.), produzidos por isolados de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato aquoso de catingueira. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.....	43
Tabela 6 - Diâmetro das colônias, número de esporos/cm ² e porcentagem de esporos viáveis (média \pm E.P.), produzidos por isolados de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de catingueira. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.....	45
Tabela 7 - Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de <i>Dactylopius opuntiae</i> pelo extrato aquoso de mamona, isolados do complexo <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) e extrato aquoso de mamona + isolados do FIESC 20-b.....	47

Tabela 8 - Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de <i>Dactylopius opuntiae</i> pelo extrato hidroetanólico de mamona, isolados do complexo <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) e extrato hidroetanólico de mamona + isolados do FIESC 20-b.....	48
Tabela 9 – Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de <i>Dactylopius opuntiae</i> pelo extrato aquoso de catingueira, isolados do complexo <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) e extrato hidroetanólico de mamona + isolados do FIESC 20-b.....	49
Tabela 10 - Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de <i>Dactylopius opuntiae</i> pelo extrato aquoso de catingueira, isolados do complexo <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) e extrato hidroetanólico de catingueira + isolados do FIESC 20-b.....	51

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. A palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	16
2.2. Cochonilha do carmim (<i>Dactylopius opuntiae</i>).....	17
2.3. Controle de insetos-praga.....	19
2.4. Controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos.....	21
2.4.1. <i>Fusarium</i> como entomopatógeno.....	23
2.4.1.1. Identificação de espécies de <i>Fusarium</i>	26
2.5. Inseticidas de origem vegetal.....	27
2.5.1. Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	29
2.5.2. Catingueira (<i>Caesalpinia pyramidalis</i>)	30
2.6. Utilização conjunta de fungos entomopatogênicos e extratos de plantas.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Procedência dos isolados de <i>Fusarium</i>	33
3.2. Identificação molecular dos isolados de <i>Fusarium</i>	33
3.2.1. Extração de DNA e obtenção das sequências das regiões TEF-1 α e β -tubulina..	33
3.3. Obtenção dos extratos vegetais.....	34
3.4. Efeito dos extratos de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> e de <i>Ricinus communis</i> sobre o crescimento vegetativo, a esporulação e a germinação dos isolados de <i>Fusarium</i>	34
3.4.1. Seleção dos isolados e concentrações dos extratos para os testes de patogenicidade.....	35
3.5. Controle de <i>Dactylopius opuntiae</i>	36
3.5.1. Criação de <i>Dactylopius opuntiae</i>	36
3.5.2. Produção e quantificação do inóculo fúngico.....	36
3.5.3. Avaliação dos extratos vegetais e isolados de <i>Fusarium</i> no controle de <i>D. opuntiae</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Identificação da espécie de <i>Fusarium</i> com base em sequências das regiões TEF-1 α e β -tubulina do DNA.....	38
4.2. Efeito dos extratos de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> e de <i>Ricinus communis</i> sobre o crescimento vegetativo, a esporulação e a germinação dos isolados de <i>Fusarium</i>	

<i>incarnatum-equiseti</i>	39
4.3. Mortalidade de <i>Dactylopius opuntiae</i> frente aos isolados do complexo <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b), extratos e associação destes.....	46
5. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* L Miller), cactácea de origem mexicana, apresenta diversas finalidades, entre elas a alimentação animal e humana, produção de energia, função medicinal e elaboração e composição de cosméticos (Almeida *et al.*, 2011). No Nordeste do Brasil, onde há hoje a maior área de palma cultivada no mundo, é uma das principais espécies destinadas à alimentação dos rebanhos animais (Lopes *et al.*, 2009). Adaptada a condições secas, desempenha um papel importante para o desenvolvimento das regiões semiáridas, onde a reduzida disponibilidade hídrica é fator limitante na produção de forragem e pastagens nativas (Nascimento, 2008).

Dentre as pragas da palma forrageira, a cochonilha do carmim, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae), tem sido considerada a mais danosa à cultura (Almeida *et al.*, 2011). O contínuo processo de alimentação pela praga, aliado ao aumento da infestação, provoca o amarelecimento, seca e morte das raquetes em curto espaço de tempo. Sob as condições do Sertão, a dispersão rápida e descontrolada do inseto é favorecida pelo clima quente que estimula vários ciclos reprodutivos durante o ano. Em alguns estados do Nordeste, sua explosão populacional tem provocado até 100% de morte das plantas, causando danos severos e consequências socioeconômicas gravíssimas em comunidades agrícolas onde a atividade leiteira é extremamente dependente do cultivo de palma, sobretudo nos períodos de seca (Lopes *et al.*, 2009, Chiacchio, 2008).

Tendo em vista os prejuízos que a cochonilha do carmim tem causado à cultura, é necessário investigar e investir em métodos que promovam o controle da praga.

A utilização de extratos vegetais para o controle de insetos é um método de baixo custo e ao alcance do agricultor. Além de ter ação seletiva, não apresenta efeito residual prolongado, decompõe-se rapidamente e tem eficiência no controle de várias espécies de insetos-praga (Brechelt, 2004, Brito *et al.*, 2008). O extrato da folha de *Caesalpinia bracteosa* Tul. mostrou eficiência no controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Góes *et al.*, 2003). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa indicaram o extrato de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* como eficiente no controle da cochonilha do carmim (dados não publicados). Devido a esses indícios, surgiu o interesse em estudar o extrato de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (catingueira) no controle da cochonilha do carmim. *Ricinus communis* L (mamona) já teve sua atividade inseticida constatada em diversos trabalhos (Okonkwo e Okoye, 1992; Niber *et al.* 1992; Pacheco e López-Olguin, 1994; Santiago 2008; MPA, 2011; Neves *et al.* 2014). Ambas as

espécies ocorrem na região do semiárido de Pernambuco, sendo de fácil acesso aos agricultores.

Isolados de *Fusarium* obtidos da cochonilha do carmim a partir de amostras de palma forrageira coletadas em vários municípios dos Sertões do Pajeú e do Moxotó, e do Agreste Meridional de Pernambuco provocaram bons índices de mortalidade sobre o inseto citado (Tiago *et al.*, 2012), podendo consistir em alternativa eficiente no controle da praga. Fungos entomopatogênicos podem ser empregados isoladamente ou integrados com outros métodos, como os inseticidas naturais de origem vegetal (Marques *et al.*, 2004). A combinação de extratos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas, além de reduzir custos e impactos ambientais (Marques *et al.*, 2004; Santos e Lima, 2011). Alguns trabalhos têm demonstrado que essa combinação é viável (Rodríguez-Lagunes *et al.*, 1997; Landa e Bohata, 1999; Pramila *et al.*, 1999; Nana *et al.*, 2012) e que pode resultar em uma ação inseticida sinérgica (Filotas *et al.*, 2005; Mohan *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2010; Rondelli *et al.*, 2011; Rosales, 2001; Gomes 2012).

A identificação de espécies de *Fusarium* baseada apenas em características morfológicas tem sido considerada inconsistente devido à ausência de características claras que distingam as espécies mais próximas, o que originou a esquemas taxonômicos que subestimam significativamente a diversidade de espécies dentro de gênero (O'Donnell *et al.*, 2008; Dhoro, 2010). O sequenciamento de DNA tem contribuído para a resolução dessas espécies (Geiser *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2011), sendo as sequências dos genes fator de alongamento de tradução 1- α (TEF1) e β - tubulina (tub2) consideradas apropriadas para a determinação de espécies de *Fusarium* (Leslie *et al.*, 2007, O'Donnell *et al.*, 2012).

Nesse sentido, os objetivos traçados para o presente trabalho foram: determinar o efeito de extratos aquosos e hidroetanólicos de *C. pyramidalis* e *R. communis* sobre o crescimento vegetativo, esporulação e germinação de isolados de *Fusarium*, visando empregá-los em conjunto no controle da cochonilha do carmim; verificar a ação inseticida desses separadamente e em combinação sobre a cochonilha em palma forrageira; e confirmar a identidade dos isolados de *Fusarium* por meio do sequenciamento das regiões β -tubulina e TEF-1 α do DNA.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

A palma forrageira (*O. ficus-indica*), cactácea originária do México, está presente em todos os continentes. Esta planta apresenta diversas finalidades, atuando na preservação do solo, forragem para o gado, biomassa para fins energéticos, elaboração e composição de cosméticos, além de servir de substrato para a produção do carmim e ser considerada como planta medicinal (Almeida *et al.*, 2011).

A FAO (Food and Agriculture Organization) reconhece o potencial da palma e sua contribuição ao desenvolvimento das regiões áridas e semi-áridas, especialmente nos países em desenvolvimento, pela exploração econômica, com consequências excelentes para o meio ambiente e para segurança alimentar (Lopes *et al.*, 2012).

No Nordeste semiárido brasileiro, onde há hoje a maior área de palma cultivada no mundo, a planta foi introduzida na segunda metade do século XIX para servir de suporte alimentar da cochonilha, produtora do corante carmim. Como a cultura da cochonilha do carmim não teve êxito, a cactácea importada passou a ser planta ornamental nos parques e jardins, até quando foi descoberta a sua utilização como forrageira (Santos *et al.*, 2006). A palma expandiu-se, estando atualmente totalmente incorporada à paisagem dessa região (Brito *et al.*, 2008).

Em função das características edafoclimáticas do semiárido do Nordeste, a pecuária se constituiu, ao longo do tempo, em uma das principais atividades econômicas da região. No entanto, devido à deficiência hídrica do solo, associada às altas temperaturas e forte evapotranspiração, a produção de forragens para os rebanhos é um dos maiores entraves para o êxito dessa atividade. O uso de algumas espécies vegetais adaptadas ao semiárido é uma forma de minimizar o problema. Nesse sentido, graças às suas características morfofisiológicas quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, e adaptação às condições adversas do semiárido, a palma, que tolera longos períodos de estiagem, consolidou-se como forrageira estratégica fundamental, possibilitando, no período das secas, a alimentação do maior rebanho de caprinos e ovinos de todo o Brasil (Lopes *et al.*, 2012).

Essa forrageira, que contém em média 90% de água, ajuda aos animais, nos períodos de seca, a suprir grande parte de sua necessidade em água. Além de ser rica em

carboidratos, principalmente carboidratos-não-fibrosos, que são a principal fonte de energia para os ruminantes, em mucilagem e resíduo mineral, apresenta alta taxa de digestão ruminal e tem alta produtividade. Os baixos teores de fibra em detergente neutro podem ser suplementados pela associação da palma com alimentos de baixo custo, permitindo produção de leite e manutenção em níveis bastante próximos aos obtidos com alimentos de maior valor comercial. Todas essas características tornaram a palma a principal fonte de alimentação dos rebanhos animais nos períodos de estiagem e importantíssima para a região do Polígono das Secas (Lopes *et al.*, 2012).

Cultivos bem conduzidos de palma forrageira produzem uma biomassa superior a 150 toneladas de matéria verde/ha/ano (ou 15 toneladas de matéria seca/ha/ano), desde que se associem práticas agronômicas adequadas e variedades de elevado potencial produtivo. Contudo, nos últimos anos tem-se observado a redução da produtividade da cultura nos diversos Estados do Nordeste, em função do ataque de pragas e patógenos. Dentre as pragas da palma forrageira, a cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*) tem sido considerada a mais danosa (Almeida *et al.*, 2011). Altamente devastadora, a praga, que chega a causar perdas de até 100% da produção, tem provocado consequências socioeconômicas gravíssimas em comunidades agrícolas onde a pecuária bovina, caprina e ovina, bem como a atividade leiteira é extremamente dependente do cultivo de palma (Lopes *et al.*, 2009).

2.2. Cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*)

A cochonilha do carmim, cujo nome científico é *D. opuntiae*, é um inseto de origem mexicana, que parasita a cactácea exótica popularmente conhecida como palma forrageira ou figueira-da-índia. O nome científico do inseto se define pela denominação científica de sua planta hospedeira: *Opuntia ficus-indica* (Nava, 2012).

Decorrente de um dimorfismo na espécie, a fêmea da cochonilha possui um ciclo de vida muito distinto do ciclo do macho. As fêmeas possuem três fases biológicas (Figura 1): ovo, ninfa (com dois instares) e adulto; ao atingirem a fase adulta, são desprovidas de apêndices locomotores, portanto, fixam-se na planta hospedeira da qual se alimentam sugando sua seiva. Cerca de 130 ovos são produzidos durante a média de 77 dias de duração do seu ciclo de vida. Os machos apresentam as fases de ovo, ninfa, prepupas, pupas e adultos; completam a metamorfose em casulos de cera branca, de onde surgem

adultos com um par de asas membranas, vivem apenas para fecundar e não se alimentam; levam cerca de 43 dias para completar a metamorfose e morrem logo após o coito. Muitos autores concordam que a duração das diferentes etapas biológicas está em função da temperatura (Flores–Hernández *et al.*, 2006; Nava, 2012).



Figura 1. Fases biológicas da fêmea de *Dactylopius opuntiae*. A: ovos. B: ninfa. C: fêmea adulta.

As ninfas jovens apresentam cor vermelha e depois de aproximadamente uma semana expelem uma substância branca filamentosa e uma secreção também branca, semelhante ao talco. Após a primeira metamorfose, a cor do inseto escurece e seu tamanho aumenta lentamente, ao passo que as secreções filamentosas e pulverulentas ficam mais abundantes. Na segunda metamorfose, a pele nova, produto da muda, abrange toda a fêmea adulta que é grande, comparado com o tamanho máximo atingido antes da oviposição. Constata-se em *D. opuntiae* reprodução sexual, contudo algumas fêmeas podem reproduzir-se partenogeneticamente (Flores–Hernández *et al.*, 2006).

D. opuntiae é uma das diversas espécies do gênero *Dactylopius* que produzem o corante carmim. Apenas as fêmeas da cochonilha são sacrificadas para extração do ácido carmínico, que produz o corante carmim, usado na composição de produtos cosméticos, alimentícios, farmacêuticos e têxteis, entre outros. O uso do carmim movimenta cerca de US\$ 75 milhões ao ano no mundo. Para cada quilo de cochonilha do carmim são necessários cerca de 150 mil insetos. Já para a extração de um quilo de ácido carmínico, usado como base para a produção de uma variedade de corantes vermelhos, é preciso o processamento de seis a oito quilos de cochonilhas (Nava, 2012).

No período da colonização mexicana, os espanhóis levaram palma e cochonilha do carmim para a Europa e para as Ilhas Canárias e Java, mantendo por muito tempo o monopólio industrial e comercial do corante. Com a independência do México, o cultivo da cochonilha do carmim passou a ter maior importância, sendo cultivada em diversos

Estados. Com a descoberta da tecnologia para se fabricar corantes sintéticos com custos mais baixos, a cultura da cochonilha entrou em decadência nos países produtores. Com a proibição para alguns corantes químicos tidos como cancerígenos pela Organização Mundial de Saúde, a demanda pelo corante carmim de cochonilha aumentou (Santos *et al.*, 2006).

A espécie criada em cactáceas, no entanto, pode transformar-se em praga se a cultura não for conduzida tecnicamente ou se forem disseminadas livremente nas plantas cultivadas (Warumby *et al.*, 2005). O inseto, disseminado por raquetes infestadas ou outras partes vivas da palma, pelo homem, por bovinos, caprinos, ovinos, pássaros ou outros animais que transitem nas lavouras atacadas, assim como pelo vento, aparece na superfície das raquetes ou cladódios como pequenas bolas brancas semelhantes a algodão, que, quando esmagadas liberam a substância avermelhada, denominada carmim. As cochonilhas também secretam uma substância açucarada que atrai formigas e facilita a proliferação de um fungo fuliginoso, conhecido por fumagina (Chiacchio, 2008; Almeida *et al.*, 2011).

A cochonilha do carmim (*D. opuntiae*), conhecida por sua agressividade, suga a seiva da palma forrageira para se alimentar. O contínuo processo de alimentação pela praga, aliado ao aumento da infestação, deixa a planta debilitada provocando o amarelecimento, seca e morte das raquetes em curto espaço de tempo. Sob as condições do Nordeste, a dispersão rápida e descontrolada tem sido favorecida pelo clima quente que estimula vários ciclos reprodutivos durante o ano. Em áreas tradicionais de cultivo, o ataque da cochonilha acontece de forma tão intensa que só tem restado aos agricultores a erradicação dos plantios, prejudicando a pecuária bovina, caprina e ovina nessa região, e, assumindo caráter de praga altamente drástica (Chiacchio, 2008; Lopes *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2011).

2.3. Controle de insetos-praga

A maioria das espécies de insetos é benéfica ou útil ao homem, e desempenha papel importante para o equilíbrio dos ecossistemas. Apenas uma parte é considerada nociva, embora um número dez vezes maior possa vir a se tornar praga devido a alterações no equilíbrio populacional (Finkler, 2012).

Fala-se de praga quando um animal, uma planta ou um microorganismo aumenta

sua densidade a níveis anormais e afeta direta ou indiretamente a espécie humana, prejudicando sua saúde, comodidade, ou construções agrícolas, florestais ou currais, dos quais o ser humano obtém alimentos, forragens, têxteis, madeira, etc. Um organismo se converte em praga quando sua densidade aumenta de tal maneira que causa uma perda econômica ao ser humano (Brechelt, 2004).

Dentre as principais atividades do homem que favoreceram o aumento populacional de insetos, destacam-se o desmatamento, monoculturas, criação intensiva de animais, superpopulação humana, condições inadequadas de escoamento de águas e de remoção de dejetos e lixos, precárias condições de moradia, alimentação, vestuário e higiene. Nessas condições algumas espécies se reproduziram com facilidade, tornando-se pragas (Finkler, 2012).

Para o controle desses organismos, o uso de agrotóxicos é um dos métodos mais utilizados. Agrotóxicos são substâncias químicas destinadas a proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas (Spadotto, 2006). Seu uso intensificou-se durante a década de 60 com a Revolução Verde, programa destinado a aumentar a quantidade de alimentos produzida, por meio do desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização do solo, utilização de agrotóxicos e mecanização do campo (Brechelt, 2004; Spadotto *et al.*, 2004).

Porém, o uso de agrotóxicos oferece riscos à saúde humana e ao ambiente, incluindo a contaminação dos solos agrícolas, das águas superficiais e subterrâneas e dos alimentos, apresentando, conseqüentemente, riscos de efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos e de intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, bem como o risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais (Spadotto *et al.*, 2004). A contínua utilização do controle químico pode ocasionar desequilíbrios populacionais, perda de inimigos naturais da praga e aquisição de resistência do inseto-praga aos produtos químicos utilizados, fazendo-se necessário aumentar a dose empregada dessas substâncias para produzir efeito (EMEPA, 2008).

Como alternativa ao uso de agrotóxicos, o controle biológico, técnica que consiste na utilização de inimigos naturais para a redução das populações de pragas, tem se revelado eficiente. O processo, que ocorre naturalmente, desempenhando importância fundamental para o equilíbrio das populações, tem sido utilizado pelo homem por meio do emprego de diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, vírus, protozoários, artrópodes (principalmente os insetos), entre outros contra populações consideradas pragas

(Brechelt, 2004; Lacey *et al.*, 2001).

As vantagens desses organismos em relação aos produtos químicos consistem na eficiência, no custo, na segurança para o homem e para o ambiente, na redução dos resíduos tóxicos nos alimentos e na preservação dos inimigos naturais, pois o controle biológico é mais seletivo, apresenta menor risco de atingir organismos não-alvo, não deixa resíduos tóxicos na lavoura, nas águas, ou no solo e, por consequência, não causa desequilíbrios e intoxicação do consumidor (Alves, 1998; Lacey *et al.*, 2011).

Em adição, os produtos biológicos possuem a capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente; produção de efeitos secundários às populações de insetos, como redução da oviposição, perda de viabilidade de ovos ou aumento da sensibilidade a outros agentes de controle; possibilitam o estabelecimento de um controle permanente, de modo a manter a população da praga sob controle após sucessivas aplicações; além da possibilidade do uso em associação com produtos de origem vegetal, em ação sinérgica e mais eficiente (Marques, 2004).

2.4. Controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos

Entre os agentes de biocontrole de insetos, os fungos preenchem uma importante posição. Por serem responsáveis por aproximadamente 80% das enfermidades que atingem insetos, foram os primeiros entomopatógenos a serem utilizados no controle microbiano. Apresentam aproximadamente 700 espécies reconhecidas como entomopatógenas, porém, apenas algumas delas são utilizadas atualmente em programas de controle. Os principais fungos empregados em programas de controle biológico pertencem aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* (= *Isaria*), *Verticillium*, *Nomuraea*, *Entomophthora* e *Aschersonia* (Lacey *et al.*, 2001; Finkler, 2012).

A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil e muitos incidem sobre pragas de importância econômica. A ocorrência desses fungos, em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, tem sido, aqui e em outros países, um fator importante na redução das populações de pragas (Alves, 1998; Rabinovitch *et al.*, 1998).

A grande variabilidade genética desses fungos pode ser considerada uma de suas principais vantagens no controle de insetos. Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, com características adequadas

para serem utilizados como inseticidas microbianos, visando o controle de grande número de pragas das culturas. Além de sua capacidade de atingir todos os estágios de desenvolvimento do hospedeiro, como ovos, larvas, pupas e adultos, podem penetrá-lo por diversas vias, incluindo a penetração via tegumento, que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral (Alves e Lopes, 2008).

O processo de infecção de insetos por fungos entomopatogênicos pode ser descrito resumidamente se iniciando pelo contato dos conídios do fungo com a cutícula do inseto, seguido da germinação dando origem ao tubo germinativo e à formação de apressórios que penetram a cutícula do inseto por meio de pressão mecânica e química, liberando enzimas capazes de degradar os componentes da cutícula. Atingindo a hemolinfa, a morte ocorre devido à produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo e outros danos físicos em decorrência do crescimento do micélio e processo de esporulação (Alves 1998). Para todos esses eventos os fungos entomopatogênicos apresentam fatores de virulência (Brito, 2011).

Os propágulos viáveis (conídios ou fragmentos de hifas), a colonização do inseto e a exteriorização do fungo sobre o cadáver infectado permitem a sua disseminação pelo vento. Acresce ainda que os gêneros de Hifomicetos entomopatogênicos mais representativos desenvolvem-se com certa facilidade em substratos de culturas artificiais (meios de cultura), como grãos de arroz. Tais meios de cultura constituem-se de substratos simples e econômicos para a obtenção de biomassa com abundante produção de propágulos (Rabinovitch *et al.*, 1998).

Embora existam dificuldades, tais como o uso ser restrito a determinados períodos do ano, em função de condições climáticas (Rabinovitch *et al.*, 1998), e a demanda de um tempo maior, em relação aos inseticidas químicos convencionais, para causar a morte dos insetos (Lacey *et al.*, 2001), os fungos entomopatogênicos têm conquistado espaço no mercado. Alguns programas de controle microbianos bem-sucedidos pelo mundo e a demanda cada vez maior de produtos menos poluentes ao meio ambiente fazem aumentar o uso de inseticidas microbianos, ainda que de modo insipiente. No Brasil, o faturamento com inseticidas microbianos tem crescido consideravelmente. Em 1998 as vendas atingiram em torno de US\$ 1 milhão (Alves, 1998), passando em 2006 a faturar em torno de US\$ 10 milhões (Alves e Lopes, 2008; Brito, 2011).

2.4.1. *Fusarium* como entomopatógeno

O Gênero *Fusarium* é um grande táxon polifilético de fungos do Filo Ascomycota, amplamente distribuído na natureza. O grupo é encontrado no solo e capaz de crescer em uma ampla gama de substratos, em associação patogênica ou não com plantas e animais. São isolados em diversas condições climáticas, sendo predominantes em ambientes temperados e tropicais (Teetor-Barsch; Roberts, 1983; Coleman *et al.*, 2011; Summerell e Leslie, 2011).

Espécies de *Fusarium* que se associam com os animais, como nematóides, aranhas, insetos, anfíbios, répteis e mamíferos têm sido descritas (Teetor-Barsch; Roberts, 1983; Gardiano, *et al.* 2009; Galindo, 2012; O'Donnell *et al.*, 2012). Dentre os animais, os insetos são os membros com os quais as espécies de *Fusarium* são mais abundantemente associadas, frequentemente como patógenos. O Gênero inclui várias espécies e isolados que são entomopatógenos fortes ou fracos e que penetram o hospedeiro vivo parcial ou totalmente, invadem feridas e, liberam toxinas debilitando o inseto (Teetor-Barsch; Roberts, 1983).

Fusarium tem sido relatado nas ordens de Insecta Orthoptera, Isoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera e Diptera, sendo mais frequente em homópteros como gafanhotos, cigarrinhas, filoxeras e coccídeos, e em dípteros como mosquitos (Teetor-Barsch; Roberts, 1983; O'Donnell *et al.*, 2012).

Fusarium incarnatum (Roberge) Saccardo foi relatado como patógeno de *Aphis craccivora* Koch (Harendrath *et al.*, 1987). Dois isolados pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* causaram níveis de mortalidade altos na vespa da castanha *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) (Hymenoptera: Cynipidae) (Addario e Turchetti, 2011), enquanto um isolado foi capaz de causar alta mortalidade em fêmeas adultas de *Matsucoccus matsumurae* (Kuwana) (Hemiptera: Coccoidea: Matsucoccidae) (Liu *et al.*, 2014). *Fusarium proliferatum* Nirenberg foi observado causando mortalidade a *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) (Lazo, 2012). Pelizza *et al.* (2011) relatou *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg em *Ronderosia bergi* (Stål) (Orthoptera: Acrididae). *Fusarium solani* (Mart.) Sacc também foi descrito ocorrendo em *Tetanops myopaeformis* (Diptera: Ulidiidae) (Majumbar *et al.*, 2008) e em *Brahmina coriacea* (Hope) (Coleoptera: Scarabaeidae) (Anupam Sharma *et al.*, 2012). *Fusarium oxysporum* Schlecht já foi relatado causando mortalidade em *Chloropulvinaria*

(=*Pulvinaria*) *psidii* Maskel (Hemiptera: Coccidae) (Golpalakrishnan e Narayan, 1989) e em *B. coriacea* (Anupam Sharma *et al.*, 2012).

Quanto ao acesso de *Fusarium* aos insetos, estruturas vegetativas do fungo são capazes de penetrar a cutícula do hospedeiro. Feridas de causas naturais ou por parasitas e predadores, assim como feridas infligidas experimentalmente, aumentam a suscetibilidade dos insetos a infecções fúngicas, inclusive pelas espécies de *Fusarium* de baixa virulência. Na maioria dos casos, essas infecções não permanecem restritas à ferida, mas levam à invasão rápida e morte do hospedeiro. Alguns membros do Gênero são conhecidos como ectoparasitas, provocando manchas acinzentadas sobre a cutícula, sem a capacidade de penetrá-la. A invasão em cochonilhas não é totalmente esclarecida. Esporodóquios encontrados sobre e sob as cochonilhas podem ser decorrentes de uma infecção genital. Nesse caso, o fungo invade via fenda vulvar e extrai seus nutrientes a partir do celoma por meio de haustório. A invasão traqueal de cochonilhas é outra possibilidade e se daria por meio de tubos germinais e hifas com ou sem uma maior penetração de tecidos corporais e invasão para dentro da cavidade do corpo do hospedeiro (Teetor-Barsch; Roberts, 1983).

Além da elevada patogenicidade de alguns isolados do Gênero *Fusarium* para insetos, outras características são consideradas promissoras para o controle, tais como: 1) Infectar, em muitos casos, todas as fases da vida do inseto, incluindo os ovos; 2) como patogênicos facultativos, apresentar um excelente potencial de sobrevivência no campo; 3) e demonstrar alta especificidade ao inseto hospedeiro quando alta patogenicidade também é relatada, não afetando cultivares (Teetor-Barsch; Roberts, 1983). A produção de beauvericina por espécies de *Fusarium*, substância produzida por fungos amplamente utilizados no controle de insetos, reitera o potencial desses fungos como agentes controladores de insetos-praga a culturas agrícolas (Alves, 1998; Logrieco *et al.*, 1998; Fotso, Leslie e Smith, 2002; Wang e Xu, 2012).

No entanto, os esforços para utilizar espécies de *Fusarium* no controle biológico têm sido limitados por alguns fatores, incluindo o fato de que muitos dos isolados de *Fusarium* entomopatogênicos são patógenos fracos e a prova de patogenicidade é difícil devido à presença de isolados do mesmo gênero que colonizam os insetos mortos e, conseqüentemente, tornam o isolamento do verdadeiro patógeno difícil. Além disso, e principalmente, há uma preocupação de liberar inadvertidamente fitopatógenos no meio ambiente, uma vez que muitas espécies do gênero são conhecidas por causar doenças em plantas e a taxonomia de *Fusarium* é problemática. A produção de micotoxinas por vários

isolados de *Fusarium*, em larga escala, pode contaminar o ambiente com quantidades de tais produtos químicos prejudiciais à saúde (Teetor-Barsch; Roberts, 1983; O'Donnell *et al.* 2012).

Portanto, considerando-se a possibilidade de utilização de *Fusarium* para o controle de insetos, sugere-se que testes de patogenicidade que forneçam um indicativo quanto especificidade dos isolados ao seu hospedeiro, assim como testes de efeitos colaterais e de segurança com insetos benéficos, mamíferos e células humanas devem ser conduzidos, como é realizado para outros fungos a serem utilizados no controle biológico; além de testes para a detecção da produção de metabólitos secundários indesejáveis (Teetor-Barsch; Roberts, 1983).

Estudos recentes indicam que membros de *Fusarium* de importância clínica e para a agricultura, incluindo os entomopatogênicos, são filogeneticamente diversos (O'Donnell *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2012). Outros trabalhos indicam que os isolados de *Fusarium* que provocam alta mortalidade a insetos também apresentam alta especificidade ao seu hospedeiro e nenhum dano em plantas, uma vez que a habilidade para parasitar requer adaptações específicas ao hospedeiro (Kuruvilla e Jacob 1979a, 1979b, 1980; Teetor-Barsch; Roberts, 1983; Martins, 2005).

Até mesmo espécies conhecidas como fitopatogênicas, a exemplo de *Fusarium oxysporum*, apresentam membros não patogênicos que podem apresentar interação simbiótica com a planta, desempenhando funções que podem ser benéficas à mesma e importantes para o controle biológico de doenças. Portanto, esses fungos apresentam um potencial benéfico de interesse agrônomico, mas que é pouco aproveitado devido a carência de estudos que gerem informações sobre a estrutura populacional desse grupo, permitindo o melhor aproveitamento desses micro-organismos de interesse agrônomico (Martins, 2005).

Outras medidas, como a avaliação do impacto sobre as populações de insetos e a observação de diferenças significativas na mortalidade entre os grupos experimentais e controle irão indicar, na maioria dos casos, a virulência do patógeno. Os métodos de aplicação do inóculo (pulverização, espanar, imersão, feltragem, dispersão por ácaros, etc.), as concentrações de inóculo e tempo de aplicação (em ensaios de campo) devem ser investigados para a obtenção da maior eficiência possível (Teetor-Barsch; Roberts, 1983).

2.4.1.1. Identificação de espécies de *Fusarium*

Ao longo da maior parte da história taxonômica de *Fusarium*, a identificação baseada apenas na observação de características morfológicas foi dominante. Porém, uma série de fatores, incluindo a ausência de características morfológicas claras separando espécies, sobretudo as mais próximas, levou a conceitos que são muito amplos, e favoreceram a criação de sistemas taxonômicos que subestimam significativamente a diversidade de espécies dentro do gênero (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2008; Dhoro, 2010).

Como consequência, diferentes conceitos de espécies (morfológico, biológico, filogenético) vêm sendo empregados, tendo em vista que, para fins taxonômicos, esquemas de classificação e nomenclatura robustos idealmente refletiriam relações naturais (Alexopoulos *et al.*, 1996, Dhoro, 2010). Nesse sentido, caracteres como compatibilidade sexual e variações na sequência de DNA são importantes para identificações precisas (Leslie e Summerell, 2006).

O conceito morfológico de espécie se baseia em semelhanças observadas entre isolados que são distintos de outros grupos de isolados com base em descontinuidades nos caracteres (Alexopoulos *et al.*, 1996; Dhoro, 2010). Alguns caracteres fisiológicos tais como a taxa de crescimento, a produção de micotoxinas e os perfis de metabólitos secundários produzidos têm sido também utilizados (Leslie e Summerell, 2006).

O conceito biológico de espécie é baseado no princípio de que indivíduos de uma mesma espécie são potencialmente cruzáveis e esse cruzamento irá gerar descendentes férteis. De modo que uma espécie seria uma população natural ou populações de indivíduos isolados reprodutivamente de outras populações (Dhoro, 2010). Nos últimos anos, o conceito biológico vem se destacando no estudo de *Fusarium* (Leslie e Summerell, 2006).

O conceito filogenético de espécie a define como grupos de indivíduos que têm uma relação genealógica partilhada, determinada pela análise filogenética (Alexopoulos *et al.*, 1996). Essa análise utiliza ferramentas moleculares, tais como a busca de sequências nucleotídicas homólogas, tendo como referência sequências em bancos de dados, a construção de árvores filogenéticas, e PCRs baseadas em ensaios com regiões de genes espécie-específicos. Com o uso dessas ferramentas as relações entre as espécies de *Fusarium* foram melhor inferidas, auxiliando na identificação dos isolados fúngicos

(Geiser *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2011).

As sequências do fator de alongamento 1- α (TEF1), β - tubulina (tub2), e primeira e segunda maior subunidade da RNA-polimerase (RPB1 e RPB2) têm sido consideradas confiáveis na determinação de espécies de *Fusarium* (Leslie *et al.*, 2007, O'Donnell *et al.* 2012), e o conceito filogenético de espécie, cada vez mais sendo aplicado para o grupo, tem resultado na definição de novas espécies, muitas vezes partindo daquelas que são intimamente relacionadas, mas para as quais faltava evidência morfológica clara de uma diferença ao nível de espécie (Geiser *et al.*, 2004). Assim, se tornou claro que as classificações baseadas apenas na morfologia muito subestimava a verdadeira diversidade no gênero (Kvas *et al.*, 2009).

Os dados moleculares, quando combinados com características morfológicas e biológicas, permitem uma identificação mais robusta. Para taxa de difícil resolução, como *Fusarium*, a integração dos conceitos de espécie morfológico, biológico e filogenético deve tornar-se a regra e não a exceção (Leslie e Summerell, 2006).

2.5. Inseticidas de origem vegetal

Inseticidas vegetais são compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas (Kim *et al.*, 2003), que compõem a própria defesa química contra os insetos herbívoros. Os princípios ativos inseticidas podem derivar de toda a planta ou partes dela, podem ser o próprio material vegetal, normalmente, moído até ser reduzido a pó, ou produtos derivados por extração aquosa ou com solventes orgânicos (Menezes, 2005).

Na Índia, por volta de 2.000 A.C., já se fazia o uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. No Egito, durante a época dos Faraós, e na China, por volta do ano de 1.200 A.C., inseticidas derivados de plantas já eram usados para controle de pragas de grãos armazenados aplicados diretamente nos grãos ou por fumigação destes. No século 16 os europeus já usavam diversas plantas para efetuarem o controle de pragas. Entretanto, após a 2ª Guerra Mundial, com o advento dos inseticidas organo-sintéticos, o uso de inseticidas botânicos foi reduzido grandemente (Moreira *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, com o aumento dos problemas de resistência de insetos a inseticidas organo-sintéticos, ressurgência e erupção de pragas, e os problemas advindos do uso indiscriminado de inseticidas organo-sintéticos sobre inimigos naturais, meio ambiente e homem e, sobretudo o desenvolvimento da agricultura orgânica (onde o uso de

defensivos organo-sintéticos é proibido) aumentou o interesse no mundo inteiro pelos inseticidas botânicos. Substâncias com menores riscos à saúde humana e ao ambiente vêm sendo avaliadas, atreladas à demanda crescente por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos. Adiciona-se ainda o rápido aumento do custo de síntese de novos produtos e a crescente dificuldade de se descobrir novas classes de compostos com ação inseticida (Kim *et al.*, 2003; Menezes, 2005; Moreira *et al.*, 2005).

Felizmente, são inúmeras as plantas possuidoras de atividade inseticida, e muitas precisam ser estudadas e introduzidas, quando possível, nas propriedades agrícolas como forma alternativa de controle de pragas. As plantas são ricas em substâncias bioativas, que são potencialmente menos tóxicas do que os compostos sintéticos, por serem menos concentrados, sofrem biodegradação rápida e ainda podem possuir múltiplos modos de ação, com amplo espectro de uso e ação seletiva dentro de cada classe de praga, resultando em menor probabilidade de desenvolvimento de resistência nos insetos (Menezes, 2005; Santos *et al.*, 2008).

As características dos produtos naturais, relativas às baixas toxicidade e persistência, fazem com que os inseticidas botânicos sejam associados a um menor impacto ambiental (Kim *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Poncio, 2010), sem efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos. No entanto, a concepção de que os inseticidas botânicos são sempre seguros é errônea. Há inseticidas botânicos registrados que são tóxicos a peixes, insetos benéficos e mamíferos, de modo que testes de toxicidade a esses organismos devem ser conduzidos. Em contrapartida, por possuírem menor persistência no ambiente, o risco que alguns inseticidas botânicos possam apresentar a organismos benéficos, homem e ambiente é minimizado (Moreira *et al.*, 2005).

Como vantagens, a utilização de extratos vegetais é um método de baixo custo e ao alcance do agricultor, não apresenta efeito residual prolongado, e tem eficiência no controle de várias espécies de insetos-praga (Brechelt, 2004; Brito *et al.*, 2008). Podem ser preparados a partir do produto “in natura” em pó, e extração aquosa ou alcóolica, formulações concentradas comerciais e semi-comerciais e purificação e isolamento dos compostos obtidos, que podem servir de modelo para síntese de novos agroquímicos, com características desejáveis, mais ativos, seletivos e com menores riscos ao homem e meio ambiente, e serem incorporados, via engenharia genética, em plantas cultivadas, minimizando os danos ocasionados por insetos pragas, microorganismos e plantas invasoras (Moreira *et al.*, 2005).

Mas apesar de haver informações sobre grande número de plantas com atividade inseticida, fungicida e efeito nematicida, ainda falta o adequado desenvolvimento de produtos que possam ser disponibilizados comercialmente (Vasantharaj, 2008). A baixa persistência, a carência de pesquisas, a dificuldade de registro e a necessidade de padronização química e controle de qualidade, são entraves para o desenvolvimento de produtos à base de plantas. Além disso, as dificuldades relacionadas ao isolamento dos princípios ativos e à concentração em diferentes partes vegetais, também são barreiras a serem rompidas e mais estudos nesta área são necessários (Costa *et al.*, 2004; Menezes, 2005; Machado, 2007).

Quanto ao modo de ação de uma substância de origem vegetal sobre os insetos, diversos efeitos podem ser observados, tais como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases (Roel, 2001). Para Brunherotto (2000), a mortalidade dos insetos por inseticidas botânicos é apenas um dos efeitos e nem sempre esse deve ser o objetivo, já que, para alcançá-lo, geralmente são necessárias concentrações elevadas do produto, o que pode tornar a técnica inviável do ponto de vista prático, pela elevada quantidade de material. O ideal é reduzir ou, se possível, impedir a oviposição e a alimentação do inseto e, conseqüentemente, o crescimento populacional da praga (Costa *et al.*, 2004; Poncio, 2010).

2.5.1. Mamona (*Ricinus communis*)

A mamoneira (*R. communis*), pertencente à família Euphorbiaceae, é uma oleaginosa que apresenta relevante importância econômica e social, com várias aplicações industriais, encontrada em estado selvagem em várias regiões do Brasil. Suas sementes, depois de industrializadas, dão origem à torta e ao óleo de mamona que, entre as diversas utilidades, é empregado na indústria de plástico, siderurgia, saboaria, perfumaria, curtume, tintas e vernizes, além de ser excelente óleo lubrificante para motores de alta rotação e carburante de motores a diesel (Oliveira *et al.*, 2005).

É uma espécie perene que pode viver mais de 12 anos, e se apresenta como alternativa de relevante importância econômica e social, pois, dadas as suas características, é capaz de produzir satisfatoriamente bem até sob condições de baixa precipitação pluvial, sobressaindo-se também como alternativa para o semiárido nordestino do Brasil. Nessa

região, a cultura, mesmo tendo sua produtividade afetada, tem-se mostrado resistente ao clima adverso quando se verificam perdas totais em outras culturas, e serve, dessa forma, como uma das poucas alternativas de trabalho e de renda para o agricultor da região (Viera e Lima, 1999; Santos *et al.*, 2008).

A mamona já teve sua atividade inseticida constatada em diversos trabalhos. O extrato aquoso do fruto verde da mamona a 10% apresentou bioatividade contra todas as fases biológicas da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*), com exceção à viabilidade pupal (Santiago, 2008). O extrato da semente de mamona, rico em ricina, foi considerado tóxico a adultos de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera Curculionidae) e *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) (Niber *et al.*, 1992).

Neves *et al.* (2014) demonstraram a eficiência de extratos de sementes e folhas da mamona em causar mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). Pacheco & López-Olguin (1994) relataram que inseticidas do pó da folha de mamona causaram a redução na emergência de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) e a morte de até 56% dos adultos em grãos armazenados de milho. O extrato do pó da folha da mamona também causou até 100% de mortes em adultos de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae) (Okonkwo e Okoye, 1992). Extratos da mamona também se mostraram promissores no combate às formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* (quenquém) e *Atta* (saúvas) (Vieira, 1997). O extrato aquoso de mamona é indicado no controle de outras pragas em geral na agricultura de base ecológica (MPA, 2011).

Dessa forma, é importante determinar se o extrato de mamona também apresenta efeito inseticida contra a cochonilha do carmim.

2.5.2. Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*)

A planta *C. pyramidalis* é uma árvore endêmica da região Nordeste da vegetação Caatinga, vegetando em lugares pedregosos. Pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, é conhecida como catingueira e está entre as plantas mais utilizadas pela população de um modo geral (Alves *et al.*, 2007), empregada popularmente como diurético, dispéptico, digestivo, antipirético, no tratamento de infecções catarrais e como agente anti-inflamatório, além de demonstrar atividade antibacteriana (Aliviano *et*

al., 2008), antinoceptiva e antioxidante (Santos *et al.*, 2011).

Há uma carência de trabalhos estudando o potencial inseticida da planta. Lima-Mendonça *et al.* (2013) estudaram a atividade inseticida do pó da folha de *C. pyramidalis* sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) e observaram uma mortalidade superior à observada no controle. O extrato da folha de *Caesalpinia bracteosa* Tul. foi eficiente no controle de *S. frugiperda* em *Zea mays* L. (Góes *et al.*, 2003). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato de *C. ferrea* foi eficiente para o controle da cochonilha do carmim (dados não publicados). Devido a essas informações, surge o interesse em estudar o extrato de *C. pyramidalis*, planta que ocorre na região do semiárido de Pernambuco, sendo de fácil acesso aos agricultores.

2.6. Utilização conjunta de fungos entomopatogênicos e extratos de plantas

Fungos entomopatogênicos podem ser empregados isoladamente ou integrados com outros métodos, como os inseticidas naturais de origem vegetal (Marques *et al.*, 2004). Vários produtos biológicos apresentam nas suas formulações inseticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas e espalhantes adesivos de origem vegetal. Alguns destes produtos podem influenciar os fungos entomopatogênicos, nos quais o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação podem ser modificados, alterando a sua virulência (Alves *et al.* 1998). Dessa forma, estudos avaliando a compatibilidade de fungos com extratos botânicos são necessários.

Alguns trabalhos têm demonstrado a viabilidade do uso de fungos entomopatogênicos em conjunto com produtos vegetais, tanto como adjuvantes em formulações (Rodríguez-Lagunes *et al.*, 1997; Nankinga *et al.*, 2000; Consolo *et al.*, 2003) quanto como sinergistas no controle de pragas (Leite *et al.*, 1995; Pramila *et al.*, 1999).

Marques *et al.* (2004) observaram que o óleo de nim afetou o crescimento e a esporulação de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, e *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith [= *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr.], porém não afetou a viabilidade dos conídios destes fungos. Enquanto que Santos; Lima (2011), visando o controle da praga *S. zeamais*, utilizaram o óleo de nim em *B. bassiana*, e observaram a inibição no crescimento vegetativo, mas não da esporulação e viabilidade dos conídios. Pramila *et al.* (1999) verificaram que sete produtos comerciais obtidos de nim, apresentaram efeitos diversos no crescimento de *B.*

bassiana, variando de inibitórios a estimulantes. Rodríguez-Lagunes *et al.* (1997), para este mesmo fungo, não observaram efeitos fungitóxicos significativos causados pelo óleo emulsionável de nim em concentrações abaixo de 5%. Efeito negativo no crescimento e germinação de conídios de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm. (= *Isaria fumosorosea* Wize) não foram constatados quando Landa; Bohata (1999) estudaram sua compatibilidade com dois inseticidas derivados de nim. Nana *et al.* (2012) verificaram que o extrato da folha de *Calpurnia aurea* Benth foi compatível com *M. anisopliae* em todas as concentrações testadas (12.5, 25, 50 e 100 mg/ml).

A combinação entre fungos entomopatogênicos e extratos vegetais pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas, uma vez que um sinergismo entre os dois agentes pode ocorrer, reduzindo custos e impactos ambientais (Marques *et al.*, 2004). Porém ainda é pouco estudada, havendo a necessidade de maiores estudos nesse sentido.

Rondelli *et al.* (2011) mostraram que as combinações isolado de *B. bassiana* com óleo de *R. communis* e isolado de *B. bassiana* com Boveril (inseticida biológico à base de esporos de *B. bassiana*) causaram contra *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) mortalidade superior a obtida pelo fungo e produtos separadamente. Na presença do azadirachtin, *B. bassiana* apresentou níveis mais elevados de infecção contra *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) e *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) (Filotas *et al.*, 2005) e contra ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Islam *et al.* 2010). A combinação de *B. bassiana* com a formulação comercial de óleo de nim Margoside† também apresentou um efeito sinérgico sobre a mortalidade em *Spodoptera litura* Fabricius (Mohan *et al.*, 2007). Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) foram mais sucetiveis a *M. anisopliae* na presença do óleo de nim (Gomes 2012). O uso combinado de produtos vegetais e fungos entomopatogênicos também foi eficiente no controle de *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae) (Rosales, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedência dos isolados de *Fusarium*

Foram utilizados seis isolados identificados morfológicamente como *F. lateritium*. Desses, cinco foram obtidos de adultos de *D. opuntiae* coletados em diferentes municípios de Pernambuco e preliminarmente selecionados como potenciais agentes de controle biológico da cochonilha (Tiago *et al.*, 2012). Foram depositados na Micoteca URM com os seguintes números de acesso: URM6776 (Sertânia), URM6777 (Sertânia), URM6778 (Tuparetama), URM6779 (Ibimirim) e URM6782 (Arcoverde). Um isolado foi obtido da palma forrageira como fungo endofítico (URM6226) (Bezerra *et al.*, 2012).

3.2. Identificação molecular dos isolados de *Fusarium*

3.2.1. Extração de DNA dos isolados de *Fusarium* e obtenção das sequências das regiões TEF-1 α e β -tubulina

A extração do DNA foi realizada com o kit de purificação de DNA - *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). A concentração do DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), utilizando-se o marcador de peso molecular DNA de fago Lambda (Invitrogen Life Technologies). As reações de amplificação foram feitas em um volume de 50 μ L contendo tampão de reação (Tris-HCl pH 8,4; KCl), MgCl₂, dNTP, primers, Taq DNA polimerase e DNA. Para a amplificação da região TEF-1 α utilizou-se os primers EF1 e EF2, tendo como parâmetros de ciclagem 8 min de desnaturação a 95°C; seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C, 20s a 53°C e 1 min a 72°C, e uma extensão final de 5 min a 72°C, segundo O'Donnell *et al.* (1998). Para a amplificação parcial do gene β -tubulina, os primers Bt2a e Bt2b foram utilizados, segundo Glass e Donaldson (1995), com desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, depois, 40 ciclos de 94°C durante 35s, 53°C durante 55s, e 72°C durante 2 min e um ciclo final de 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose 1,5%, corados com GelRedTM e visualizados sob luz UV.

Os produtos amplificados foram purificados com PureLink – PCR Purification Kit – Invitrogen e sequenciados na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica – UFPE. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências contidas

no Banco de Dados FUSARIUM-ID disponível em <http://fusarium.cbio.psu.edu> para a confirmação da identificação da espécie.

3.3. Obtenção dos extratos vegetais

Para a confecção dos extratos, folhas de catingueira (*C. pyramidalis*) e de mamona (*R. communis*) foram coletadas no interior do Estado de Pernambuco e trazidas para o laboratório de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os extratos foram confeccionados a partir das folhas secas à temperatura ambiente e trituradas.

Para o extrato aquoso, o material vegetal triturado foi suspenso em água destilada, em uma concentração de 30%, permanecendo em repouso por 48h e seguido de filtração. Para o extrato hidroetanólico, o material vegetal triturado, dissolvido em etanol a 70%, formando uma suspensão na concentração de 30%, permaneceu em repouso por 2h, seguido de filtração. Para evitar a interferência do etanol, este foi evaporado em Banho-Maria à temperatura de 45°C por 16 horas e acrescentou-se água até o volume inicial (Celoto *et al.*, 2008).

As soluções foram esterilizadas em vapor fluente por 15 minutos e cada extrato diluído em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) ainda líquido (45°C) nas concentrações de 5%, 10% e 20%.

3.4. Efeito dos extratos de *Caesalpinia pyramidalis* e de *Ricinus communis* sobre o crescimento vegetativo, a esporulação e a germinação dos isolados de *Fusarium*

Avaliou-se o crescimento vegetativo, a esporulação e a germinação em cada tipo de extrato vegetal (catingueira e mamona) em dois métodos de extração (aquoso e hidroetanólico), totalizando quatro extratos, cada um testado nas concentrações de 5%, 10% e 20%.

Para a determinação da taxa de crescimento vegetativo, discos de 0,12 cm² contendo micélio dos fungos foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio BDA (controle) e contendo o meio BDA acrescido, separadamente, de cada extrato (aquoso e hidroetanólico) a ser testado nas concentrações de 5%, 10% e 20%. Após sete dias de incubação a 28°C, os diâmetros das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) foram mensurados utilizando-se uma régua. Para a avaliação da

produção de conídios, blocos cilíndricos (0.28 cm²) retirados das colônias fúngicas acima referidas foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml de solução Tween 80 (0,01%), e, após agitação em vortex, o número de conídios foi estimado em câmara de Neubauer. Para a taxa de germinação, suspensões de 10⁶ conídios/ml, estiveram em contato com as concentrações do extrato e com água destilada esterilizada (controle) durante três horas. Após, 50 µl dessas suspensões foram semeados em cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA e, após 16 horas de incubação, foi realizada, em microscópio óptico, a contagem de 200 conídios por repetição, entre germinados e não germinados, a fim de se verificar o percentual de germinação (Alves, 1998).

Para as variáveis crescimento vegetativo e esporulação, o delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 4, sendo seis isolados de *Fusarium* e três concentrações do extrato vegetal, mais controle (ausência de extrato), totalizando 24 tratamentos, com três repetições. Para a variável taxa de germinação, o delineamento foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos (três concentrações do extrato vegetal, mais controle) e três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.5 beta (Silva & Azevedo 2009).

3.4.1. Seleção dos isolados e concentrações dos extratos para os testes de patogenicidade

A seleção dos isolados a serem testados sobre a cochonilha com cada extrato e da melhor concentração do extrato foi baseada no modelo IB (Índice Biológico), desenvolvido por Rossi-Zalaf *et al.* (2008) para caracterizar a compatibilidade de fungos entomopatogênicos com produtos inseticidas *in vitro*. Assim, foram calculados os valores percentuais médios de esporulação (ESP), crescimento vegetativo (CV) das colônias dos fungos e germinação (GERM) com relação ao controle, sendo aplicada, para cada concentração do produto, a seguinte fórmula: $IB = [47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GERM)] / 100$. Os valores de IB para a classificação dos produtos quanto à compatibilidade com entomopatógenos são: Tóxico de 0 a 41, moderadamente tóxico de 42 a 66 e compatível > 66.

3.5. Controle de *Dactylopius opuntiae*

3.5.1. Criação de *Dactylopius opuntiae*

Para a utilização de cladódios de palma infestadas por *D. opuntiae* nos experimentos, foi mantida uma criação do inseto em casa de vegetação (Figura 2) no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Cladódios de palma sadios, conduzidos periodicamente de Caruaru PE para a sede do IPA, eram colocados em contato com as palmas já infestadas da criação para a manutenção da mesma. No vigésimo dia após a infestação, cladódios infestados eram utilizados nos experimentos.



Figura 2. Criação de *Dactylopius opuntiae* sobre *Opuntia ficus-indica* em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco.

3.5.2. Produção e quantificação do inóculo fúngico

Os isolados de *Fusarium* foram cultivados em BDA, e incubados durante sete dias, em estufa para BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), visando o crescimento vegetativo e a esporulação. Padronizou-se utilizar suspensões de 1×10^7 conídios/ml, estimadas em câmara de Neubauer conforme a metodologia utilizada por Alves & Morais (1998).

3.5.3. Avaliação dos extratos vegetais e isolados de *Fusarium* no controle de *D. opuntiae*

Quatro mL das suspensões de conídios dos fungos + extrato vegetal (aquoso e/ou hidroetanólico) na concentração compatível com o fungo foram pulverizados sobre palmas com aproximadamente 20 dias de infestação do inseto. Anteriormente, solução detergente a 0,02% foi pulverizada sobre as palmas com o intuito de diminuir a quantidade de cera

sobre o inseto e facilitar o contato do mesmo com o tratamento. Em cada ensaio, os extratos vegetais e os isolados de *Fusarium* também foram testados individualmente. Na testemunha, os insetos foram pulverizados com água destilada esterilizada, mais espalhante adesivo Tween 80 (0,01%). Após a aplicação, mantiveram-se as palmas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias.

Passados os 10 dias, para a avaliação da mortalidade total e confirmada, cada palma foi delimitada em três áreas de aproximadamente 8 cm^2 , sendo 50 insetos adultos avaliados em cada área, totalizando 150 insetos avaliados para cada palma/tratamento. A mortalidade total foi avaliada com o auxílio de estereomicroscópio pela observação de características como a coloração e turgidez dos insetos (Figura 3). Para a análise de mortalidade confirmada, submeteram-se os insetos dos tratamentos que incluíram fungos e do controle a um processo de desinfestação em álcool 70%, solução de hipoclorito de sódio 4% e água destilada esterilizada, visando a transferência dos insetos para meio de cultura BDA com antibiótico para a confirmação do agente causal.

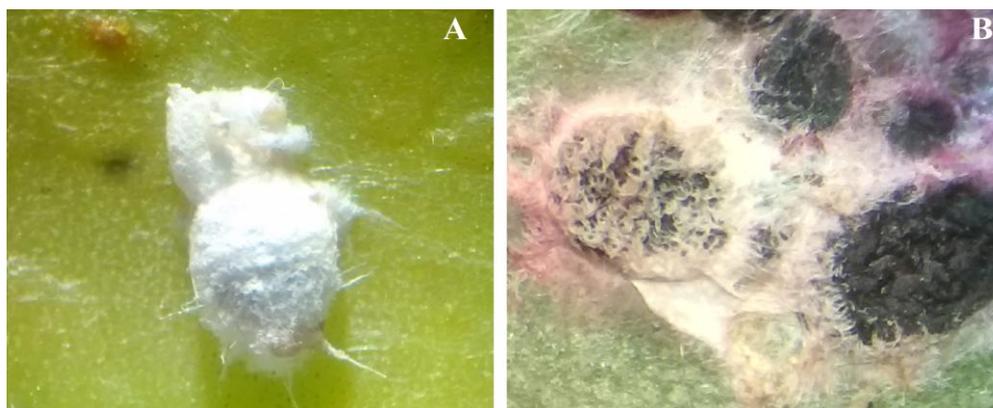


Figura 3. Adultos de *Dactylopius opuntiae* sobre a palma forrageira, visualizados com estereomicroscópio. **A:** Inseto: controle. **B:** Inseto: tratamento fungo + extrato.

Para calcular a mortalidade corrigida, os dados de mortalidade total foram submetidos à fórmula de Abbott (1925), em que:

A porcentagem de eficiência no tratamento = (número de insetos vivos no controle – número de insetos vivos no tratamento) / número de insetos vivos no controle X 100.

Na análise estatística foi feita a análise de variância e para a comparação das médias utilizou-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.5 beta (Silva & Azevedo 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação da espécie de *Fusarium* com base em sequências das regiões TEF-1 α e β -tubulina do DNA

A identificação molecular por meio de sequências da região TEF-1 α revelou que os seis isolados identificados morfológicamente como *F. lateritium* foram resolvidos em uma espécie filogenética pertencente ao Complexo de Espécies *F. incarnatum-equiseti*, denominada 20-b, segundo O'Donnell *et al.* (2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos isolados de *Fusarium*, segundo O'Donnell *et al.* (2009), após o sequenciamento das regiões TEF-1 α e β -tubulina do DNA, comparadas com o Banco de Dados Fusarium-ID.

Isolados	Espécies filogenéticas (TEF-1 α)	Espécies filogenéticas (β -tubulina)
URM6776	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex 20-b (97,67%)	<i>Fusarium</i> sp. (94%)
URM6777	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex 20-b (99,67%)	<i>Fusarium</i> sp. (94,01%)
URM6778	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex 20-b (99,54%)	<i>Fusarium</i> sp. (94,33%)
URM6779	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex 20-b (99,84%)	<i>Fusarium</i> sp. (93,95%)
URM6782	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex 20-b (99,04%)	<i>Fusarium</i> sp. (93,7%)
URM6226	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex 20-b (mlst 98,88 ou id 94,72%)	<i>Fusarium</i> sp. (94,33%)

O Complexo de espécies *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) é considerado um dos mais ricos em espécies de *Fusarium* insetícolas. Das 30 espécies filogenéticas do FIESC conhecidas, 15 foram recuperadas de insetos pertencentes a três ordens diferentes, sendo a maioria (26 em 31 isolados) proveniente de insetos Hemiptera, ordem que compreende a cochonilha do carmim (O'Donnell *et al.*, 2012). Das espécies pertencentes ao FIESC, apenas três são denominadas por binômios latinos, as demais são identificadas por números árabes e os diferentes haplótipos por letras romanas minúsculas. Essa classificação refere-se à nomenclatura descrita recentemente por O'Donnell *et al.* (2009), tendo como base estudo filogenético.

Com relação à identificação baseada nas sequências do gene β -tubulina, ainda que essa região esteja entre as mais comumente utilizadas para a identificação de espécies de *Fusarium* (Leslie *et al.*, 2007), para o presente estudo elas não foram resolutivas (Tabela 1). O gene do fator de alongamento 1- α (TEF-1 α) parece ser consistentemente de cópia única em *Fusarium*, e mostra um nível elevado de polimorfismo de sequências entre espécies intimamente relacionadas, mesmo em comparação com porções ricas em introns de genes como a β -tubulina. Por estas razões, TEF tornou-se o marcador de escolha como uma ferramenta de identificação de um único *locus* para *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004).

Em relação às classificações anteriores, *Fusarium incarnatum* e *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo não são relatados significativamente como patógenos de plantas (Leslie e Summerell, 2006), no entanto o papel das duas espécies de FIESC no ambiente deve ser verificado. Essas espécies foram citadas pela sua capacidade em produzir beauvericina, toxina inseticida produzida por fungos amplamente utilizados no controle de insetos (Logrieco *et al.*, 1998; Azliza *et al.*, 2014). A espécie *F. incarnatum* e, com relação à classificação mais recente, isolados do FIESC foram relatados como patógenos de várias espécies de insetos (Hareendranath *et al.* 1987; Addario e Turchetti, 2011; O'Donnell *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014), mostrando que o FIESC apresenta membros promissores para o controle microbiano de insetos.

4.2. Efeito dos extratos de *Ricinus communis* e de *Caesalpinia pyramidalis* sobre o crescimento vegetativo, a esporulação e a germinação dos isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti*

Quanto ao efeito do extrato aquoso de mamona sobre o crescimento vegetativo dos isolados do FIESC (Tabela 2), as respostas variaram de inibitórias a estimulantes, sendo que para a maioria dos isolados, o extrato foi inibitório em alguma concentração. O isolado URM6782, entretanto, não teve o crescimento influenciado pelas diferentes concentrações do extrato utilizadas, enquanto o isolado URM6226 foi estimulado pelo extrato aquoso de mamona a 10% e indiferente frente às demais concentrações. Resultados semelhantes foram obtidos por Pramila *et al.* (1999) estudando a compatibilidade de sete produtos comerciais obtidos de nim, testados nas concentrações de 10.000, 1.000 e 100 ppm, com isolados de *B. bassiana*. Com relação à produção de esporos, em nenhuma concentração do extrato observou-se redução em relação ao controle, mas constatou-se o aumento significativo da esporulação na presença do extrato a 5% e 20% para os isolados URM6776, URM6778 e URM6226. A estimulação da produção de esporos pelo extrato pode ser tida como uma vantagem promissora no controle combinado, pois é uma característica associada à virulência do patógeno e que está sendo incrementada pelo extrato. Não foi observada interferência significativa em função das concentrações do extrato sobre a viabilidade dos conídios.

O extrato hidroetanólico de mamona (Tabela 3) causou uma redução do crescimento vegetativo de todos os isolados do FIESC. Contudo, em relação à esporulação não foi constatada interferência negativa pelo extrato, com exceção apenas ao isolado

URM6779, que apresentou uma redução da produção de esporos nas concentrações de 5% e 20%. Quanto à taxa de germinação, observou-se uma redução significativa somente para o isolado URM6226 na concentração de 20%, os demais tratamentos não intervieram na viabilidade dos esporos. Resultados semelhantes foram obtidos por Marques *et al.* (2004), que observaram que o óleo de nim reduziu o crescimento de colônias de *B. bassiana*, *P. farinosus* (= *I. farinosa*) e *M. anisopliae* nas concentrações testadas (de 0,0048% a 5%), com exceção na concentração 0,0048% para os dois primeiros fungos e 0,039% para o último fungo referido. A esporulação também foi significativamente reduzida pelo óleo de nim, exceto na concentração 0,0048% para *B. bassiana*; contudo, não se verificou efeito do óleo na viabilidade dos esporos dos fungos. Santos e Lima (2011) também observaram que, sendo o crescimento vegetativo das colônias de *B. bassiana* alterado nos meios com extrato de nim, a esporulação e viabilidade dos conídios não foram prejudicadas. Para Loria *et al.* (1983), a inibição do crescimento vegetativo é uma indicação da fungitoxicidade menos representativa do que a viabilidade dos esporos, uma vez que os patógenos infectam os insetos pela germinação de conídios.

Tabela 2. Diâmetro das colônias, número de esporos/cm² e porcentagem de esporos viáveis (média ± E.P.), produzidos por isolados de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato aquoso de mamona. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.

Isolado	Diâmetro da colônia CV% = 4,51				Número de esporos/cm ² (x10 ⁶) CV% = 58,00				Viabilidade dos esporos ^a CV% = 7,42			
	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%
URM6776	5,77±0,36 dA	4,30±0,17 cB	4,40±0,10 bB	4,65±0,17 bB	5,56±1,10 aC	172,72±39,1 8 aB	96,23±25,0 3 abBC	371,03±26,0 7 aA	90,33±1, 83	89,83±2, 61	90,17±4, 08	84,50±2, 08
URM6777	8,22±0,31 abA	7,43±0,33 bB	7,75±0,01 aAB	7,50±0,16 aB	43,45±12, 38 aA	14,98±12,45 bA	23,31±2,49 abA	68,45±4,89 cA	94,33±1, 42	88,17±3, 75	82,50±6, 08	87,00±2, 29
URM6778	8,33±0,04 abA	7,68±0,06 abAB	7,87±0,05 aAB	7,55±0,07 aB	34,33±6,9 4 aC	252,78±108, 74 aA	81,05±8,12 abBC	184,72±106, 84 bcAB	76,67±0, 83	74,33±4, 04	80,00±4, 19	81,67±0, 83
URM6779	8,73±0,04 aA	8,25±0,12 aAB	7,20±0,06 aB	7,83±0,18a B	31,75±18, 77 aA	1,09±0,09 bA	16,17±8,28 aA	73,81±34,64 bcA	84,17±6, 71	73,50±2, 56	86,00±5, 62	84,83±7, 41
URM6782	7,63±0,16 bA	7,53±0,07 abA	7,53±0,11 aA	7,15±0,21 aA	83,33±15, 10 aA	14,38±4,02 bA	29,96±4,10 abA	73,61±7,91 bcA	96,33±1, 48	96,33±0, 60	94,50±0, 57	94,67±1, 85
URM6226	6,65±0,05 cB	7,02±0,44 bAB	7,52±0,09 aA	7,18±0,10a AB	69,15±15, 42 aB	212,60±38,9 8 aA	152,78±21, 89 aAB	204,37±43,1 4 bA	84,17±4, 28	87,33±3, 44	85,17±4, 76	90,33±2, 68

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas) pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

^a Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo.

Tabela 3. Diâmetro das colônias, número de esporos/cm² e porcentagem de esporos viáveis (média ± E.P.), produzidos por isolados de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de mamona. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.

Isolado	Diâmetro da colônia CV% = 7,11				Número de esporos/cm ² (x10 ⁶) CV% = 86,51				Viabilidade dos esporos CV% = 10,11			
	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%
URM6776	5,30±0,0 5 bA	2,67±0,3 3 dB	2,93±0,2 8 dB	3,10±0,2 5 cB	25,10±2,12 cA	1,49±0,62 aA	69,74±17,6 2 abA	54,76±12,9 8 bA	91,33±1,74 aA	81,33±2,16 abA	83,17±5,64 abA	74,67±11,0 7 aA
URM6777	7,43±0,2 4 aA	3,10±0,1 2 cdC	4,05±05 cB	4,30±0,2 3 bB	40,48±12,2 0bcA	4,86±0,52 aA	11,21±2,21 bA	51,39±3,08 bA	67,00±2,17 bA	62,00±3,75 cA	63,83±1,83 cA	62,00±2,78 aA
URM6778	7,73±0,1 0 aA	4,33±0,0 4 bB	5,00±0,1 2 abB	4,63±0,0 1 bB	43,75±7,39 abcA	18,25±1,43 aA	63,99±13,5 8 abA	30,56±6,37 bA	74,67±0,92 abAB	83,50±1,80 abA	64,33±7,53 bcB	62,00±5,57 aB
URM6779	8,17±0,1 5 aA	5,30±0,2 7 aB	5,70±0,0 5 aB	5,50±0,0 7 aB	188,49±49, 43 abA	19,64±7,72 aB	57,04±16,2 6 abAB	3,27±1,63 bB	79,17±7,65 abAB	95,83±1,42 aA	95,00±1,32 aA	76,83±1,36 aA
URM6782	7,45±0,2 6 aA	3,03±0,1 4 dC	4,07±0,3 2 cB	4,42±0,1 1 bB	15,87±6,50 cA	2,08±0,74 aA	3,47±1,38 bA	5,26±2,71 bA	87,17±3,03 aA	84,17±10,3 1 abA	96,00±0,28 aA	94,50±0,28 aB
URM6226	7,75±0,2 2 aA	3,92±0,3 5 bcC	4,63±0,1 7 bcBC	4,93±0,2 1 abB	131,75±46, 81 aA	3,17±0,26 aB	110,12±29, 55 aA	157,74±61, 51 aB	89,17±1,09 aA	76,00±2,08 bcAB	77,17±2,61 abcAB	71,50±3,05 aB

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas) pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

O extrato aquoso de catingueira não interferiu sobre o crescimento e germinação dos conídios dos isolados do FIESC (Tabela 4). Com relação à esporulação só foi constatado redução para três isolados (URM6778, URM6779 e URM6226) nas concentrações de 10% e 20% para o primeiro, 10% para o segundo e 5% para o terceiro. No trabalho de Landa; Bohata (1999), investigando a ação de dois inseticidas derivados de nim sobre *P. fumosoroseus* (= *I. fumosorosea*), também não foram constatados efeitos negativos sobre o crescimento e germinação de conídios, indicando o potencial de combinação entre esses agentes.

Enquanto o extrato aquoso de catingueira não exerceu influência sobre o crescimento vegetativo dos isolados utilizados, o extrato hidroetanólico da mesma planta, nas concentrações testadas, reduziu significativamente o crescimento das colônias do FIESC, com exceção ao isolado URM6776 no extrato a 5% (Tabela 5). Depiere *et al.* (2005) também observaram que as colônias de *B. bassiana* desenvolvidas em meio de cultura contendo extrato aquoso da semente de nim tiveram crescimento vegetativo significativamente reduzido em comparação com o tratamento testemunha. Esses autores também demonstraram que mesmo havendo diferença significativa entre o crescimento e esporulação na presença de inseticidas de origem vegetal em relação ao controle, o produto pode ser considerado compatível em determinadas concentrações.

Quanto à esporulação e à viabilidade dos esporos, o efeito do extrato variou entre os isolados nas diferentes concentrações, não sendo observada uma relação direta entre o aumento da concentração do extrato e a diminuição da esporulação e viabilidade, tendo em vista que em alguns casos os valores obtidos nas concentrações de 10% e/ou 20% foram superiores aos obtidos no extrato a 5% (Tabela 6). Diferentemente, Depiere *et al.* (2005) constataram que a redução do crescimento vegetativo, esporulação e germinação de *B. bassiana* na presença do óleo de nim (0,5% 1% e 1,5%) foi diretamente proporcional ao aumento da concentração. É necessária a realização de estudos a fim de entender o mecanismo de ação de produtos de *C. pyramidalis* sobre fungos, o que ajudaria a explicar essa diferença.

Tabela 4. Diâmetro das colônias, número de esporos/cm² e porcentagem de esporos viáveis (média ± E.P.), produzidos por isolados de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato aquoso de catingueira. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.

Isolado	Diâmetro da colônia* CV% = 13,45				Número de esporos/cm ² (x10 ⁶) CV% = 55,65				Viabilidade dos esporos ^a CV% = 5,15			
	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%
URM6776	5,65±0,9 5	3,72±0,1 5	3,95±0,5 8	3,93±0,0 7	18,75±0,30 aA	33,23±5,11 abA	38,50±6,62 abA	31,94±1,10 abA	96,67±1, 45	99,17±0, 44	96,00±0, 76	98,00±0, 76
URM6777	7,68±0,5 2	6,78±0,2 7	7,10±0,5 9	6,85±0,5 8	35,62±2,53 aA	17,96±7,86 abA	28,08±2,18 abA	22,02±6,49 abA	99,83±0, 17	99,83±0, 17	99,67±0, 33	99,50±0, 29
URM6778	8,10±0,2 1	6,50±0,0	6,50±0,0	6,17±0,2 5	55,36±2,25 aA	26,88±1,89 abAB	13,29±0,77 bB	6,65±2,29 bB	95,67±2, 96	96,50±1, 32	80,00±5, 77	87,33±4, 51
URM6779	6,95±1,3 3	6,07±0,9 2	8,22±0,0 3	5,77±0,6 3	50,50±19,8 9 aA	42,36±7,79 aAB	16,57±4,96 abB	21,73±9,38 abAB	93,83±1, 17	82,17±7, 07	87,00±3, 21	84,33±3, 17
URM6782	8,22±0,1 2	5,85±0,1 5	5,73±0,0 9	5,42±0,0 6	34,13±9,75 aA	4,17±0,96 bA	2,88±0,26 bA	3,37±1,10 bA	98,50±0, 29	96,83±0, 60	95,67±1, 20	93,67±1, 74
URM6226	8,35±0,0 5	5,92±0,4 9	6,10±0,0 6	4,95±0,0 8	55,16±13,0 3 aA	13,69±6,63 abB	51,59±17,6 7 aA	45,24±23,1 5 aAB	93,67±2, 85	93,5±0,7 6	91,17±5, 60	90,83±2, 46

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas) pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^a Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo.

Tabela 5. Diâmetro das colônias, número de esporos/cm² e porcentagem de esporos viáveis (média ± E.P.), produzidos por isolados de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) em meio BDA + diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de catingueira. FIESC 20-b = URM6776, URM6777, URM6778, URM6779 e URM6782 e FIESC 16-a = URM6226.

Isolado	Diâmetro da colônia CV% = 4,74				Número de esporos/cm ² (x10 ⁶) CV% = 48,48				Viabilidade dos esporos CV% = 4,23			
	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%
URM677 6	5,58±0,0 8 bA	2,75±0,0 0 bA	2,12±0,0 6 cB	1,20±0,12 cC	9,82±1,20 cA	7,44±0,69 bA	5,56±1,63 bA	0,89±0,30 aA	97,33±0, 17 aA	98,33±0, 17 aA	97,50±0, 58 aA	97,67±0, 17 aA
URM677 7	9,00±0,0 0 aA	5,07±0,0 7 aB	4,50±0,0 0 aB	1,67±0,33 bcC	67,36±3,04 abAB	38,99±5,76 abBC	81,85±14,34 aA	10,62±3,25 aC	87,83±1, 17 bAB	87,00±2, 84 bcAB	89,33±2, 17 abA	80,67±0, 44 bcB
URM677 8	8,50±0,0 0 aA	4,32±0,0 6 aB	3,47±0,0 3 bC	2,10±0,10 abD	43,25±11,03 bcA	32,94±1,73 abA	30,16±3,95 bA	12,10±1,76 aA	95,50±0, 50 abA	91,50±2, 00 abcA	91,50±0, 29 abA	89,33±4, 60 abA
URM677 9	9,00±0,0 0 aA	5,25±0,2 5 aB	4,42±0,0 8 aB	2,62±0,20 aC	47,52±4,64 bcA	5,36±1,64 bB	33,33±9,17 bAB	27,58±8,52 aAB	92,00±2, 31 abA	83,83±0, 88 cAB	78,67±1, 09 cB	66,50±5, 77 aC
URM678 2	9,00±0,0 0 aA	4,90±0,1 0 aB	4,37±0,0 9 abB	1,67±0,44 bcC	80,06±15,47 abA	31,85±5,81 abB	85,91±12,68 aA	2,08±1,07 aB	94,67±1, 69 abA	96,83±0, 67 aA	95,33±0, 33 aA	92,83±1, 09 aA
URM622 6	8,50±0,0 0 aA	4,38±0,0 7 aB	3,45±0,0 5bC	1,50±26,83 bcD	102,08±26,8 3 aA	57,04±5,54 aB	106,15±31,7 0 aA	2,78±0,98 aC	97,50±0, 50 aA	94,67±0, 44 abA	83,33±1, 92 bcB	72,83±5, 04 cdC

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas) pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Em referência aos valores de Índice Biológico (IB), foi no extrato aquoso de mamona em que se observou o maior número de tratamentos compatíveis (16 em 18), bem como os maiores valores (Tabela 6). Esse resultado pode ser um indício da ocorrência de sinergismo da ação inseticida dos fungos selecionados combinados com o extrato aquoso de mamona, o que se confirmou posteriormente nos testes contra a cochonilha do carmim (ver tópico 4.3). Quanto ao extrato hidroetanólico de mamona, a combinação com três isolados (URM6777, URM6779 e URM6782) se revelou incompatível. Para os demais isolados, apenas a concentração de 5% foi considerada nociva. A classificação dos extratos aquoso e hidroetanólico de catingueira quanto à compatibilidade com os fungos variou de acordo com o isolado e concentração do extrato testada, sendo que o extrato aquoso apresentou um maior número de tratamentos compatíveis (12 em 18) em relação ao extrato hidroetanólico que apresentou apenas quatro tratamentos compatíveis.

Para as duas espécies vegetais testadas, os extratos aquosos causaram menor interferência nas características estudadas dos isolados do FIESC. Os solventes utilizados na preparação dos extratos constituem fator de importância na explicação da atividade tóxica dos mesmos, pois são determinantes para a extração das substâncias bioativas (Adams *et al.*, 1988; Rohde *et al.*, 2013). A utilização de extrato aquoso e em baixas concentrações facilitará o trabalho do agricultor no momento da confecção do extrato

Baseando-se na obtenção de altos índices IB, os isolados URM6776 e URM6778 combinados com os extratos aquoso (5%) e hidroetanólico (10%) de *R. communis* foram os mais indicados para os testes de patogenicidade contra *D. opuntiae*. Para os extratos de *C. pyramidalis*, os isolados URM6776 e URM6777 combinados ao extrato aquoso na concentração de 10%, e os isolados URM6777 e URM6782 com o extrato hidroetanólico também na concentração de 10% foram os mais indicados.

Tabela 6. Classificação da compatibilidade dos isolados de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) com os extratos aquoso e hidroetanólico de mamona e catingueira, em diferentes concentrações (valor IB, segundo Rossi-Zalaf *et al.*, 2008)

Isolado	% extrato	Extrato de Mamona Aquoso		Extrato de Mamona Hidroetanólico		Extrato de Catingueira Aquoso		Extrato de Catingueira Hidroetanólico	
		Valor IB	Classificação	Valor IB	Classificação	Valor IB	Classificação	Valor IB	Classificação
FIESC 20-b (URM6776)	0%	100		100		100		100	
	5%	1381,83	Compatível	35,10	Tóxico	117,39	Compatível	65,83	Moderadamente tóxico
	10%	790,66	Compatível	154,60	Compatível	131,09	Compatível	52,16	Moderadamente tóxico
	20%	2919,04	Compatível	129,48	Compatível	116,12	Compatível	24,04	Tóxico
FIESC 20-b (URM6777)	0%	100		100		100		100	
	5%	66,69	Compatível	34,02	Tóxico	73,19	Compatível	61,25	Moderadamente tóxico
	10%	74,81	Compatível	47,04	Moderadamente tóxico	87,33	Compatível	85,92	Compatível
	20%	119,86	Compatível	45,71	Moderadamente tóxico	78,47	Compatível	24,66	Tóxico
FIESC 20-b (URM6778)	0%	100		100		100		100	
	5%	369,69	Compatível	55,46	Moderadamente tóxico	68,69	Compatível	66,20	Compatível
	10%	155,68	Compatível	101,90	Compatível	56,40	Moderadamente tóxico	58,73	Moderadamente tóxico
	20%	284,64	Compatível	66,49	Compatível	50,07	Moderadamente tóxico	33,00	Tóxico
FIESC 20-b (URM6779)	0%	100		100		100		100	
	5%	54,61	Moderadamente tóxico	49,75	Moderadamente tóxico	85,85	Compatível	41,38	Tóxico
	10%	74,46	Compatível	65,56	Moderadamente tóxico	78,94	Compatível	61,78	Moderadamente tóxico
	20%	152,21	Compatível	42,55	Moderadamente tóxico	66,48	Compatível	45,85	Moderadamente tóxico
FIESC 20-b (URM6782)	0%	100		100		100		100	
	5%	63,81	Moderadamente tóxico	34,44	Tóxico	15,37	Tóxico	52,92	Moderadamente tóxico
	10%	69,60	Compatível	46,08	Moderadamente tóxico	13,91	Tóxico	79,02	Compatível
	20%	91,83	Compatível	52,95	Moderadamente tóxico	14,90	Tóxico	19,63	Tóxico
FIESC 16-a (URM6226)	0%	100		100		100		100	
	5%	192,18	Compatível	33,31	Tóxico	53,96	Moderadamente tóxico	57,97	Moderadamente tóxico
	10%	158,37	Compatível	72,69	Compatível	84,28	Compatível	72,34	Compatível
	20%	188,59	Compatível	91,37	Compatível	72,83	Compatível	16,93	Tóxico

4.3. Mortalidade de *Dactylopius opuntiae* frente aos isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b), extratos e associação destes

No bioensaio envolvendo o extrato aquoso de mamona a 5% (Tabela 7), a mortalidade corrigida variou de 61.23% a 100%, quando aplicado somente o extrato e a combinação do isolado URM6778 e extrato, respectivamente. Em relação aos dados de mortalidade corrigida, constatou-se que a associação entre o isolado URM6778 e o extrato aquoso de mamona a 5% foi mais eficiente em causar a mortalidade da cochonilha do que esses agentes empregados isoladamente. Esse efeito sinérgico, almejado quando se utiliza o controle combinado, já foi constatado em diversos trabalhos visando o emprego de fungos entomopatogênicos com agrotóxicos (Zeck, 1992; Almeida *et al.*, 1998; Neves e Alves, 1999; Ramakrishnan *et al.*, 1999; Paula *et al.*, 2011), e em alguns trabalhos mostrando a eficiência do uso combinado de fungos e produtos de origem vegetal contra insetos.

A combinação de *B. bassiana* com o regulador de crescimento de insetos à base de nim (azadirachtin) provocou uma mortalidade superior e mais rápida em ninfas de *B. tabaci* (Islam *et al.* 2010) e em *M. persicae* e *A. gossypii* (Filotas *et al.*, 2005) do que a aplicação de esporos do fungo isoladamente. Rondelli *et al.* (2011) constataram que um isolado de *B. bassiana* + óleo de mamona provocaram contra *P. xylostella* mortalidade superior à obtida pelo fungo e óleo de mamona separadamente. O mesmo foi observado utilizando Boveril (inseticida biológico à base de esporos de *B. bassiana*) + óleo de mamona. A combinação de *B. bassiana* com a formulação comercial de óleo de nim Margoside† também apresentou um efeito sinérgico sobre a mortalidade em *S. litura* (Mohan *et al.*, 2007). Gomes (2012) demonstrou que a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* frente ao tratamento *M. anisopliae* + óleo de nim foi reduzida em 70% enquanto esses agentes separadamente causaram, respectivamente, a morte de apenas 7.78% e 1.12% das larvas. O uso combinado de extrato aquoso de *Melia azedarach* L. 5%, óleo de nim 2% e Nimkol 0,2% com *B. bassiana* também foi eficiente no controle de *H. tenuis*, sendo que a combinação dos derivados vegetais com esporos de *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios/ml tenderam a superar a mortalidade provocada pelos tratamentos isolados. Numa maior concentração de conídios (5×10^8 conídios/ml), a tendência à maior eficiência foi observada apenas com o Nimkol-L (Rosales, 2001). Segundo Alves e Almeida (1995), a maior eficiência constatada na estratégia do uso combinado de inseticidas e fungos

entomopatogênicos pode ser explicada pelo fato de que o inseticida pode matar ou estressar os insetos, tornando-os mais sensíveis ao fungo.

Quanto à mortalidade confirmada, percentuais altos também foram obtidos, sendo verificada diferença entre todos os tratamentos teste e o controle, no qual não foi observado crescimento de *Fusarium*. Entre os tratamentos houve diferença apenas entre a combinação dos isolados URM6776 e URM6778 com o extrato, sendo constatado o menor (68,66%) e o maior (100%) percentual de mortes confirmadas, respectivamente.

Tabela 7. Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de *Dactylopius opuntiae* pelo extrato aquoso de mamona, isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e extrato aquoso de mamona + isolados do FIESC 20-b

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Corrigida	Confirmada
Controle		0,00 \pm 0,00 c
Extrato aquoso de mamona a 5%	61,23 \pm 3,52 c	-
Isolado URM6776	87,04 \pm 2,83 b	79,33 \pm 5,93 ab
Isolado URM6776 + Extrato aquoso de mamona a 5%	82,84 \pm 0,81 b	68,66 \pm 10,35 b
Isolado URM6778	83,89 \pm 4,13 b	86,66 \pm 3,71 ab
Isolado URM6778 + Extrato aquoso de mamona a 5%	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
CV%	5,76	14,45

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

No tratamento isolado URM6778 e extrato foi possível a confirmação do agente causal das mortes sobre a própria palma, que apresentava insetos bastante ressecados e com crescimento fúngico aparente (Figura 4). A preparação de lâminas diretas possibilitou confirmar *Fusarium* como o fungo presente.



Figura 4. Insetos mortos de *Dactylopius opuntiae* sobre a palma forrageira no tratamento Isolado URM6778 do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) + Extrato de mamona aquoso a 5%, visualizados com estereomicroscópio.

Em experimentos utilizando isolados do FIESC contra a vespa da castanha (*D. kuriphilus*), observou-se com frequência os corpos dos insetos envolvidos por micélio dos fungos (Addario e Turchetti, 2011). Tosi *et al.* (2014) observaram em condições naturais

de campo isolados de *Fusarium proliferatum* envolvendo os cadáveres de larvas, pupas e adultos de *D. kuriphilus*. Pelizza *et al.* (2011) também observaram fiálides e conídios crescendo dos insetos mortos dez dias após a inoculação de *F. verticillioides* sobre *R. bergi*. A ocorrência da exteriorização dos fungos sobre os corpos dos insetos contribui para a sua disseminação, fator importante para o biocontrole.

No bioensaio envolvendo o extrato hidroetanólico de mamona a 10% (Tabela 8), não foi observada diferença para a mortalidade corrigida causada pelos diferentes tratamentos. Assim como no primeiro bioensaio (Tabela 7), a utilização dos extratos vegetais foi tão eficiente quanto o seu uso combinado com os fungos, apresentando valores de mortalidade corrigida próximos aos observados na literatura. Pacheco e López-Olguin (1994) relataram que inseticidas do pó de folhas da mamona causaram 56% de mortalidade dos adultos de *S. cerealella* em grãos armazenados de milho. Já no trabalho de Okonkwo e Okoye (1992), o extrato das folhas de mamona causou a mortalidade total de até 100% de adultos de *C. maculatus*. No trabalho de Neves *et al.* (2014) a mortalidade total observada em larvas de *A. aegypti* pelos extratos de sementes e folhas da mamona foi de 100%. De acordo com Rosales (2001), o efeito tóxico dos extratos depende da espécie de artrópode sobre a qual estão atuando. O órgão da planta do qual se originou o extrato também deve ser levado em consideração, uma vez que a concentração das substâncias inseticidas varia em diferentes órgãos da planta (Costa *et al.*, 2004; Menezes, 2005; Santiago, 2008).

A mortalidade confirmada (Tabela 8) diferiu do controle apenas nos tratamentos do uso combinado do isolado URM6776 e extrato e isolado URM6778, com os valores de 39.33 e 32.66%, respectivamente. Nos demais tratamentos teste, a confirmação do fungo como o agente causal das mortes ocorreu somente em 12.00 e 11.33% dos insetos, não diferindo dos tratamentos citados anteriormente, mas também se assemelhando ao controle.

Tabela 8. Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de *Dactylopius opuntiae* pelo extrato hidroetanólico de mamona, isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e extrato hidroetanólico de mamona + isolados do FIESC 20-b

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Corrigida	Confirmada ^a
Controle		0,00 b
Extrato hidroetanólico de mamona a 10%	65,95 \pm 0,04 a	-
Isolado URM6776	77,15 \pm 0,04 a	12,00 ab
Isolado URM6776 + Extrato hidroetanólico de mamona a 10%	81,13 \pm 0,04 a	39,33 a
Isolado URM6778	76,27 \pm 0,04 a	32,66 a
Isolado URM6778 + Extrato hidroetanólico de mamona a 10%	74,07 \pm 0,03 a	11,33 \pm 0,00 ab
CV%	9,25	106,04

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^a Dados originais; para a análise estatística foram transformados em \sqrt{x} .

No bioensaio que incluiu o extrato aquoso de catingueira a 10% (Tabela 9), não foi observada diferença para a mortalidade corrigida obtida entre os tratamentos, com valores variando de 73,80% a 88,98%. Os valores de mortalidade confirmada variaram de 8,00% a 37,33%, sendo que a única diferença foi observada entre o tratamento URM6777 e controle. O fato de os valores de mortalidade confirmada terem sido baixos pode estar associado à ocorrência de septicemia generalizada que, de acordo com Loureiro *et al.* (2005), pode interferir no crescimento vegetativo do fungo inoculado pela presença de outros microrganismos, como bactérias. É possível também que os fungos inoculados não tenham sido os responsáveis pela maioria das mortes. Além disso, para esse trabalho deve-se levar em consideração que os fungos não foram os únicos agentes empregados sobre os insetos, o extrato também pode ser responsável por parte das mortes e não pode ser avaliado na mortalidade confirmada.

Outro fator que pode ter contribuído para a obtenção de baixos valores de mortalidade confirmada nestes tratamentos, refere-se ao fato de que os fungos podem não ter conseguido penetrar nas cochonilhas, devido à quantidade da cera produzida sobre elas. Pois apesar da padronização da quantidade de dias após a infestação para a utilização das palmas nos experimentos, não é possível ter o controle sobre o arranjo dos insetos sobre a palma e da quantidade de cera sobre os mesmos. Essa camada protetora produzida pelos insetos do gênero *Dactylopius* é constituída por substâncias gordurosas e cerosas e funciona como uma barreira para a entrada do fungo. Dessa forma, é uma das explicações para a ineficiência de produtos como fungos e extratos de plantas que apesar de eficientes sob outras circunstâncias, não conseguem transpor as camadas de cera e gordura e atingir os indivíduos localizados no interior da colônia (Carvalho *et al.*, 2005).

Tabela 9. Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de *Dactylopius opuntiae* pelo extrato aquoso de catingueira, isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e extrato aquoso de catingueira + isolados de FIESC 20-b

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Corrigida	Confirmada ^a
Controle		0,00 \pm 0,00 b
Extrato aquoso de catingueira a 10%	74,58 \pm 2,85 a	-
Isolado URM6776	76,71 \pm 2,36 a	17,33 \pm 3,71 ab
Isolado URM6776 + Extrato aquoso de catingueira a 10%	79,77 \pm 2,35 a	22,00 \pm 14,00 ab
Isolado URM6777	88,98 \pm 5,65 a	37,33 \pm 21,83 a
Isolado URM6777 + Extrato aquoso de catingueira a 10%	73,80 \pm 2,98 a	8,00 \pm 3,06 ab
CV%	7,61	120,64

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^a Dados originais; para a análise estatística foram transformados em \sqrt{x} .

No bioensaio envolvendo o extrato hidroetanólico de catingueira a 10% (Tabela 10), a mortalidade corrigida variou de 69,73 a 80,57%, não havendo diferença entre os tratamentos. Com relação à mortalidade confirmada, os valores obtidos variaram de 4,00% a 73,33%, sendo observada diferença entre o uso combinado do isolado URM6777 e extrato e o controle.

Tabela 10. Mortalidade total corrigida e confirmada (percentual médio \pm E.P.) de *Dactylopius opuntiae* pelo extrato hidroetanólico de catingueira, isolados do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e extrato hidroetanólico de catingueira + isolados de FIESC 20-b

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Corrigida	Confirmada ^a
Controle		0,00 \pm 0,00 b
Extrato hidroetanólico de catingueira a 10%	69,73 \pm 0,05 a	-
Isolado URM6777	75,34 \pm 0,05 a	49,33 \pm 20,54 ab
Isolado URM6777 + Extrato hidroetanólico de catingueira a 10%	80,57 \pm 0,04 a	73,33 \pm 9,68 a
Isolado URM6782	77,56 \pm 0,04 a	28,00 \pm 28,00 ab
Isolado URM6782 + Extrato hidroetanólico de catingueira a 10%	72,11 \pm 0,03 a	4,00 \pm 4,00 ab
CV%	9,87	90,82

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^a Dados originais; para a análise estatística foram transformados em \sqrt{x} .

A mortalidade corrigida causada pelos extratos aquoso e hidroetanólico de catingueira sobre a cochonilha foi superior à mortalidade total observada por Lima-Mendonça *et al.* (2013) pelo pó da folha de catingueira sobre *S. zeamais*, que embora tenha sido superior à observada no controle, foi de apenas 12,5%.

Estudando a mortalidade da cochonilha do carmim pelos entomopatógenos *B. bassiana*, *Paecilomyces sp.*, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W.Gams e *Manisopliae*, Brito (2011), constatou que apenas isolados de *B. bassiana* foram patogênicos aos adultos de *D. opuntiae*. Dos isolados de *B. bassiana* testados sobre o inseto, somente dois apresentaram percentuais de mortalidade superiores ao controle, com os valores de 52% e 48%, inferiores aos percentuais de mortalidade corrigida obtidos neste trabalho.

Na carência de estudos com isolados de *Fusarium* contra *D. opuntiae*, é importante descrever a eficiência de *Fusarium*, incluindo isolados do FIESC, em causar mortalidade sobre outros insetos.

Fusarium proliferatum foi relatado como patógeno a *Thaumastocoris peregrinus*, sendo capaz de causar a mortalidade média de 40% dos insetos em 24 horas após a inoculação, atingindo 100% de mortalidade ao sexto dia (Lazo, 2012). A mortalidade causada por *F. verticillioides* sobre *R. bergi* foi de 58% dez dias após a inoculação (Pelizza *et al.*, 2011). Majumbar *et al.* (2008), trabalhando com *F. solani* obtiveram em testes de laboratório mortalidade confirmada de 80% das pupas de *T. myopaeformis* 10 dias após a

inoculação de uma suspensão de $2,8 \times 10^6$ conídios/ml. Já Golpalakrishnan e Narayan (1989), relataram *F. oxysporum* causando mortalidade em *C. psidii* que variou de 68,40% ao utilizar uma suspensão de $4,8 \times 10^5$ conídios/ml a 100% com uma suspensão de $4,8 \times 10^8$ conídios/ml. Ao utilizar a mesma concentração testada no presente trabalho (10^7) o percentual de mortalidade foi de 83,30%, valores próximos aos obtidos contra a cochonilha quando os isolados do FIESC foram empregados isoladamente.

Testes de patogenicidade utilizando *F. oxysporum* e *F. solani* isolados de *B. coriacea* de campos de batata contra o último estágio larval desse inseto, relatou esses fungos causando a morte (percentual corrigido) de 49,63% e 42,59% dos insetos ao 15º dia, respectivamente. Enquanto *F. equiseti*, isolado do solo desses campos causou a morte de 10,74% dos insetos. No 30º dia, o percentual de mortes corrigido causado por *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. equiseti* foi de 85,93%, 81,85% e 21,11%, respectivamente (Anupam Sharma *et al.*, 2012).

Em se tratando de *Fusarium incarnatum-equiseti*, dois isolados de FIESC (25b e 3b) causaram altos efeitos letais (60-70%) na vespa da castanha *D. kuriphilus* (Addario e Turchetti, 2011). Sua eficácia em causar a morte de indivíduos de *D. kuriphilus*, sua ação rápida (apenas sete dias) e abundante esporulação são elementos considerados vantajosos para o biocontrole. Um isolado de FIESC foi capaz de causar, em apenas oito dias após a inoculação, a morte de 83% de fêmeas adultas de *M. matsumurae*, inseto praga de pinheiros chineses (*Pinus tabulaeformis* Carr. e *P. massoniana* Lamb.) (Liu *et al.*, 2014). Esses dados mostram que o FIESC apresenta membros promissores para o controle microbiano de insetos.

Embora o isolado endofítico (URM6226) não tenha sido selecionado para os testes sobre a cochonilha do carmim, devido ao fato de outros isolados terem apresentado valores de IB superiores, testes preliminares demonstraram que ele apresenta patogenicidade ao inseto, causando o percentual de mortalidade corrigida de 26,78%, sendo a confirmação das mortes pelo fungo observada em 18% dos insetos. Microrganismos endofíticos são aqueles capazes de habitar o interior de tecidos de plantas sem causar danos à mesma. Inicialmente acreditava-se que esses organismos eram neutros, sem causar benefícios ou prejuízos às plantas, mas a partir do momento em que esses organismos foram mais estudados, concluiu-se que, em muitos casos, eles desempenham um importante papel na proteção do hospedeiro contra patógenos e predadores, incluindo insetos (Azevedo *et al.*, 2000; Lacava e Azevedo, 2014).

Diversos trabalhos comparando o desempenho de plantas na presença e na ausência de fungos endofíticos constataram que os ataques por insetos são mais frequentes na ausência desses microrganismos (Gaynor e Hunt, 1983; Barker *et al.*, 1984; Prestidge *et al.*, 1984; Ahmad *et al.*, 1987; Mathias *et al.*, 1990). Em alguns trabalhos, a taxa de mortalidade dos insetos também foi relacionada à presença desses fungos (Lasota *et al.*, 1983; Eichenser e Dahlman, 1992), demonstrando que fungos endofíticos são capazes de atuar no controle de insetos. Mas a maioria relata a inoculação dos fungos nas plantas e não diretamente sobre os insetos, como realizado no presente estudo. Contudo, o potencial de fungos endofíticos para o controle de insetos é uma realidade e o isolado URM6226 deve ser estudado em trabalhos futuros.

Em laboratório, todos os tratamentos testados neste trabalho revelaram potencial para serem testados em campo contra a cochonilha do carmim, uma vez que altos valores de mortalidade corrigida foram observados. No entanto, o tratamento Isolado URM6778 + Extrato de mamona aquoso a 5% se destacou, sendo o mais indicado para o controle da cochonilha do carmim.

É necessário conduzir outros estudos a fim de verificar a eficiência desses tratamentos em condições de campo. Recomenda-se também a realização de testes que possam fornecer mais informações sobre a segurança do uso desses isolados no controle da cochonilha do carmim, para que esses tratamentos possam ser produzidos e disponibilizados como produto eficiente para o controle da praga.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados de *Fusarium* provenientes da cochonilha do carmim e da palma forrageira pertencem ao Complexo de Espécies *F. incarnatum-equiseti* (FIESC).
- Os extratos aquosos e hidroetanólicos de mamona e catingueira são compatíveis com alguns dos isolados do FIESC.
- Para a maioria dos extratos estudados, a concentração de 10% é a mais indicada para os testes em combinação com os isolados do FIESC 20-b.
- Todos os tratamentos testados são eficientes contra a cochonilha do carmim.
- A combinação sinérgica entre o isolado URM6778 e o extrato aquoso de mamona a 5% é a mais indicada para testes no campo contra a cochonilha do carmim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Adams, R.P., McDaniel, C.A., Carter, F.L. 1988. Termiticidal activities in the heartwood, bark/sapwood and leaves of *Juniperus* species from the United States. *Biochemical Systematics and Ecology* 16 (5): 453-456.
- Addario, E., Turchetti, T. 2011. Parasitic fungi on *Dryocosmus kuriphilus* in *Castanea sativa* necrotic galls. *Bulletin of Insectology* 64 (2): 269-273.
- Ahmad, S., Govindarajan, S., Johnson-Cicalese, J.M. and Funk, C.R. 1987. Association of a fungal endophyte in perennial ryegrass with antibiosis to larvae of the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 43:287-294.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Almeida, A.A., Silva, R.A., Araújo, W.L., Oliveira, A.V.B., Leite, D.T. 2011. Problemas Fitossanitários Causados pela Cochonilha do Carmim a Palma Forrageira no Cariri Ocidental Paraibano. *Revista Verde* 6 (3): 98-108.
- Almeida, J.E.M. Controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) com isca associada a inseticidas e/ou *Beauveria bassiana* em cana-de-açúcar. 1998. 131f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Alves, E.U., Cardoso, E.A., Bruno, R.L.A., Alves, A.U., Galindo, E.A., Junior, J.M.B. 2007. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Revista Árvore* 31 (3): 405-415.
- Alves, S.B., Almeida, J.E.M. 1995. Novas alternativas para o controle microbiológico de cupins. In: Berti Filho, E., Fontes, L.R. (Eds.) *Aguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba: FEALQ, pp. 95-102.
- Alves, B.S., Lopes, R. B. 2008. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B. (ed.) *Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ. Vol. 14. pp.69-104.
- Alves, S.B., Moino, Jr., Almeida, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves, S.B. (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, pp.217-238.
- Alves, S.B., Moraes, S.A. 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba, FEALQ, pp. 765-778.
- Alves, S.B. 1998. Produção de fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba, FEALQ, pp. 845-869.
- Alviano, W.S., Alviano, D.S., Diniz, C.G., Antonioli, A.R., Alviano, C.S., Farias, L.M., Carvalho, M.A., Souza, M.M., Bolognese, A.M. 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology* 56 (6): 545-552.
- Ameen, M.K.M. 2012. Screening of *Fusarium* isolates pathogenicity *in vitro* by using the larvae of *Galleria Mellonella* L. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*, 38 (3): 19-28.
- Anand, R., Tiwary, B.N. 2009. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to eggs and larvae of *Spodoptera litura*, the common cutworm. *Biocontrol Science and Technology* 19 (9): 919-929.
- Anupam Sharma, Chandla, V.K., Thakur, D.R. 2012. Biodiversity and Pathogenicity Potential of Mycoflora Associated with *Brahmina coriacea* in Potato Fields of North-Western Indian Hills. *Journal of Entomology* 9: 319-331.

- Arantes A.M.V.T., Correia, A.C.B. 1999. Diversidade de fungos associados a *Parlatoria ziziphus* (Lucas) (Hemiptera: Diaspididae) em Citros. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28 (3).
- Araujo Jr., J.M., Marques, E.J., Oliveira, J.V. 2009. Potencial de Isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do Óleo de Nim no Controle do Pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropical Entomology* 38(4): 520-525.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, W., Pereira, J.O., Araújo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic journal of Biotechnology, Valdivi* 3:40–65.
- Azliza, I.N., Hafizi, R., Nurhazrati, M., Salleh, B. 2014. Production of Major Mycotoxins by *Fusarium* Species Isolated from Wild Grasses in Peninsular Malaysia. *Sains Malaysiana* 43(1): 89–94.
- Barker, G.M., Pottinger, R.P., Addison, P.J., Prestidge, R.A. 1984. Effect of *Lolium* endophyte fungus infection on behaviour of adult Argentine stem weevil. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 7: 271-277.
- Bezerra, J.D.P., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Paiva, L.M., Souza-Motta, C.M. 2012. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1989-1995.
- Blaney B. J., Green P. E., Connole M. D. 1985. Fungal metabolites with insecticidal activity: relative toxicity of extracts of fungal cultures to sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wied.). *General and Applied Entomology* 17: 42-46.
- Brechelt, A. 2004. *Manejo Ecológico de Pragas e Doenças*. Santiago de Chile: Rede de Ação em Praguicidas e suas Alternativas para a América Latina. 33p.
- Brito, E.S.G. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle da cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). 2011. 127f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes-RJ.
- Brito, C. H., Lopes, E. B., Albuquerque, I. C., Batista, J. L. 2008. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-do-carmim na Paraíba. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 8(2): 1-5.
- Brunherotto, R.; Vendramim, J. D. 2001. Bioatividade de extratos aquosos de *Mellia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. *Neotropical Entomology* 30: 455-459.
- Carvalho, R. A., Lopes, E. B.; Silva, A.C., Leandro, R. S., Campos, V. B. 2005. Controle alternativo da cochonilha-do-carmim em palma forrageira no cariri paraibano. Disponível em:<www.mma.gov.br/port/sbf/invasoras/capa/docs/paineis/ss>. Acesso em: 19 novembro 2014.
- Celoto, M.I.B., Papa, M.F.S., Sacramento, L.V.S., Cleoto, F.J. 2008. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletrotichum gloesporioides*. *Acta Scientiarum* 30:1-5.
- Chiacchio, F. P. B. 2008. Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. *Bahia Agrícola* 8 (2):12-14.
- Coleman, J.J., Muhammed, M.; Kasperkovitz, P.V., Vyas, J.M.; Mylonakis, E. 2011. Fusarium pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biology* 115: 1279-289.
- Consolo, V.F., Salerno, G.L., Beron, C.M. 2003. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. *BioControl* 48(6): 705-712.
- Costa, E.L.N., Silva, R.F.P., Fiuza, L.M. 2004. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biologica Leopoldensia* 26 (2): 173-85.

- Depieri, R. A., Martinez, S. S., Menezes Jr, A. O. 2005. Compatibility of the fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. *Neotropical Entomology* 34: 601-606.
- Dhoro, M. Identification and differentiation of *Fusarium* species using selected molecular methods. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculty of Science, University of Zimbabwe, Zimbabwe.
- Eichenseher, H. and Dahlman, D.L. 1992. Antibiotic and deterrent qualities of endophyte-infected tall fescue to two aphid species (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 21: 1046-1051.
- EMEPA-PB 2008. Manejo integrado da cochonilha-do-carmim na Paraíba. Lopes, E. B.; Albuquerque, I. C.; Brito, C. H.; Batista, J. L. Relatório anual de pesquisa e experimentação. Lagoa Seca,. 35p.il.
- Filotas, M., Sanderson, J., Wraight, S. 2005. Compatibility and potential synergism between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the insect growth regulator azadirachtin for control of the greenhouse pests *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. 38th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Alaska, USA, p. 81.
- Finkler, C.L.L. 2012. Controle de insetos: uma breve revisão. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica* 8 e 9: 169-189.
- Flores-Hernández, A., Murillo-Amador, B., Rueda-Puente, E. O., Salazar-Torres, J. C., García-Hernández, J. L., Troyo-Diéguez, H. 2006. Reproducción de cochinita silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homóptera: Dactylopiidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77 (1): 97-102.
- Fotso J, Leslie JF, Smith JS 2002. Production of Beauvericin, Moniliformin Fusaproliferin, and Fumonisin B1, B2, and B3 by Fifteen Ex-Type Strains of *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10): 5195-5197.
- Galindo, M.K.F. Microbiota fúngica e parasitas presentes em *Tropidurus hispidus* (Spix 1825), Pernambuco, Brasil. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade do Minho Campus Gualtar, Braga, Portugal.
- Gardiano, C.G., Ferraz, S., Lopes, E.A., Ferreira, P.A., Amora, D.X., Freitas, L.G. 2009. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. *Ciências Agrárias* 30 (3): 551-556.
- Gaynor, D.L. and Hunt, W.F. 1983. The relationship between nitrogen supply, endophytic fungus and Argentine stem weevil resistance in ryegrass. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 44: 257-263.
- Glass, N.L.; Donaldson, G.C. 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied And Environmental Microbiology* 61(4): 1323-1330.
- Geiser, D. M., Jimenez-Gasco, M. M.; Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N. Ward, T. J.; Zhang, N., Kulda, G.A., O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
- Góes, G.B., Neri, D.K.P., Chaves, J.W.N., Maracajá, P.B. 2003. Efeito de extratos vegetais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Caatinga* 16: 47-49.
- Gopalakrishnan, C., Naraynan, K. 1989. Occurrence of *Fusarium oxysporum* Schlectt and its pathogenicity on guava scale *Chloropulvinaria psidii* Maskel (Hemiptera: Coccidae). *Current Science* 58 (2): 92-93.
- Gomes, S.A. Avaliação da toxicidade de extratos da alga *Laurencia dendroideae* e de *Azadirachta indica* (nim) e sinergismo entre o óleo de nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti*. 2012. 70f. Dissertação (Mestrado

- em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hareendranath, V., Nair, K. P. V., Paulose, S., 1987. *Fusarium pallidioroseum* (Cooke) Sacc. as a fungal pathogen of *Aphis craccivora* Koch.- *Entomon* 12: 392-394.
- Islam, M.T., Castle, S.J., Shunxiang, R. 2010. Compatibility of the insect pathogenic fungus, *Beauveria bassiana* with neem against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134: 28-34.
- Kim, S.I., Roha, J., Kima, D., Leeb, H., Ahn, Y. 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research* 39 (3): 293-303.
- Kuruvilla, S., Jacob, A. 1979a. Comparative susceptibility of nymphs and adults of *Nilaparvata lugens* to *Fusarium oxysporum* and its use in microbial control. *Agricultural Research Journal of Kerala* 17: 287-288.
- Kuruvilla, S. & Jacob, A., 1979b. Host range of the entomogenous fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht and its safety to three crop plants. *Current Science* 48: 603.
- Kuruvilla, S. & Jacob, A., 1980. Studies on *Fusarium oxysporum* Schlecht infecting rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* Stal. *Agricultural Research Journal of Kerala* 18:51- 54.
- Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Steenkamp, E.T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Lacava, P.T., Azevedo, J.L. 2014. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: Verma, Vijay C.; Gange, Alan C. (Org.). *Advances in Endophytic Research*. 1ed. New Delhi: Springer 1: 231-256.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biocontrol* 21, 230-248.
- Landa, Z., Bohata, A. 1999. Compatibility of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with natural insecticides based on azadirachtin and neem oil. *Collection of Scientific Papers – Series for Crop Sciences, Ceske Budejovice*, 16(2): 99-106.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, JD, Gibson, TJ, Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-8.
- Lasota, J.A., Waldvogel, M.G. and Shetlar, D.J. 1983. Fungus found in galls of *Adelges abietis* (L.) (Homoptera: Adelgidae): identification within tree distribution and possible impact on insect survival. *Environmental Entomology* 12: 245-246.
- Lazo, M. L. S. R. Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, (Hemiptera: Thaumastocoridae). 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Leite, L.G., H.M. Takada, C.L. Cardoso, O.V. Villela, A. Batista-Filho & J.C. Aguiar. 1995. Controle do gorgulho aquático do arroz *Oryzophagus oryzae*, pelo fipronil e óleo mineral associado ao fungo *B. bassiana*. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 24: 339-344.
- Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L., Lee, Y. 2007 Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 119: 25–32.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa.

- Lima-Mendonça, A., Broglio, S.M.F., Araújo, A.M.N., Lopes, D.O.P., Dias-Pini, N.S. 2013. Efeito de pós vegetais sobre *Sitophilus zeamais* (Mots., 1855) (Coleoptera: Curculionidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 80(1): 91-97.
- Liu, W., Xie Y., Dong, J., Xue J., Zhang, Y., Lu, Y., Wu, J. 2014. Pathogenicity of Three Entomopathogenic Fungi to *Matsucoccus matsumurae*. *PLoS ONE* 9 (7): 1-9.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; KostECKI, M.; Golinski, P.; Ritieni, A.; Chelkowski, J.. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3084–3088.
- Lopes, E. B., Albuquerque, I. C., Brito, C. H., Batista, J. L. 2009. Velocidade de Dispersão de *Dactylopius opuntiae* em Palma Gigante (*Opuntia ficus-indica*). *Revista Engenharia Ambiental* 6(2): 644-649.
- Lopes, Edson Batista (Org.). Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no Semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA-PB, 2012. 256 p.
- Loria, R., Galaini, S., Roberts, D.W. 1983. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. *Environmental Entomology* 12: 1724-1726.
- Loureiro, E.S., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Pessoa, L.G.A. 2005. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. *Neotropical Entomology* 34: 791-798.
- Machado, L.A., Silva, V.B., Oliveira, M.M. 2007. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. *Biológico* 69(2): 103-106.
- Majumbar, A., Boetel, M.A., Jaronski, T.S. 2008. Discovery of *Fusarium solani* as a naturally occurring pathogen of sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) pupae: Prevalence and baseline susceptibility. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 1-8.
- Mathias, J.K., Ratxcliffe, R.H. and Hellman, J.L. 1990. Association of an endophytic fungus in perennial ryegrass and resistance to the hairy chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Economic Entomology* 83:1640-1646.
- Marques, R. P., Monteiro, A. C., Pereira, G. T. 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Revista Ciência Rural* 34(6): 1675-1680.
- Martins, M.K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. 2005. 124f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Menezes, E.L.H. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos 205).
- Mohan, M. C., P. Narasimha, N. P. Reddy, U. K. Devi, R. Kongara, and H. C. Sharma. 2007. Growth and insect assays of *Beauveria bassiana* with neem to test their compatibility and synergism. *Biocontrol Science and Technology* 17: 1059-1069.
- Moura, M.S.B., Souza, L.S.B., Silva, T.G.F., Sá, I.I.S. 2011. Zoneamento Agroclimático da Palma Forrageira para o Estado de Pernambuco. *Documentos Embrapa Semiárido* 242, 26 p.
- Moreira, M. D.; Picanço, M. C.; Silva, É. M.; Moreno, S. C.; Martins, J. C. 2005. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: Venzon, M.; Paula Júnior T. J.; Pallini, A. (Eds). *Controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 89-120.
- Movimento dos Pequenos Agricultores. 2011. *Caderno de estudos para as bases: Agroecologia, tecnologias alternativas para a agricultura camponesa*.
- Nana, P., Maniania, N.K., Maranga, R.O., Boga, H.I., Kutima, H.L., Eloff, J.N. 2012. Compatibility between *Calpurnia aurea* leaf extract, attraction aggregation, and

- attachment pheromone and entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on viability, growth, and virulence of the pathogen. *J Pest Sci* 85:109–115.
- Nankinga, C. M., Moore, D. 2000. Reduction of banana weevil populations using different formulations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 10(5): 645-657.
- Nascimento, J. P. Caracterização morfológica e estimativa da produção de *Opuntia ficus-indica*, mil sob diferentes arranjos populacionais e doses de fósforo no semi-árido da Paraíba, Brasil. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.
- Nava, R. R. A cochonilha vale ouro: narrativas cromáticas do carmim / Raquel Nava Rodrigues. 2012. 154f. Dissertação (Mestrado em Arte) – Universidade de Brasília, Instituto de Artes, Departamento de Artes Visuais.
- Neves, R.T., Rondon, J.N., Silva, L.I.M., Peruca, R.D., Itavo, L.C.V., Carvalho, C.M.E., Souza, A.P., Fabri, J.R. 2014. Efeito larvicida de *Ricinus communis* L. *Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* 8(1): 127-131.
- Niber, T., Helenius, J., Varis, A.L. 1992. Toxicity of plant extracts to three storage beetles (Coleoptera). *Journal Applied Entomology* 113: 202-208.
- O'Donnell K., Humber, R.A., Geiser, D.M., Kang, S., Park, B., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Johnston, P.R., Aoki, T., Rooney, A.P., Rehner, S.A. 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous *Fusaria* inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLSTL. *Mycologia* 104: 427-445.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origin of the fungus causing Panama disease of banana; concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M. E., Zhang, N., Geiser, D.M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2477–2490.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M.G., Gueidan, C., Crous, P.W., Geiser, D.M. 2009. Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47(12): 3851-3861.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A.J., Balajee, S.A., Schroers, H.J., Summerbell, R.C., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y., Kang, S., Park, B., Geiser, D.M. 2010. Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying *Fusaria* from Human and Animal Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 48(10): 3708-3718.
- Okonkwo, E.U., Okoye, W.I. 1992. The control of *Callosobruchus maculatus* (F.) in stored with dried ground *Ricinus communis* (L.) leaves in Nigeria. *International Journal of Pest Management* 38 (3): 237-238.
- Oliveira, I.P., Santos, K.J.G., Beltrão, N.E.M., Neves, B.P., Araújo, A.A., Oliveira, L.C. 2005. Potenciais da mamona (*Ricinus communis* L.) na Região Centro-Oeste Brasileira. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos* 1(2): 104 -130.
- Pacheco, Y.S.Y., López-Olguin, J.F. 1994. Combate de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) em maiz armazenado à nível de laboratório usando polvos vegetales. In: Congresso Nacional de Entomologia, 29, Monterrey. *Memorias*. Monterrey: SME, p. 256.

- Paula, A.R., Carolino, A.T., Paula, C.O., Samuels, R.I. 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitas e Vetores* 4 (8): 1-8.
- Pelizza, S.A., Stenglein, S.A., Cabello, M.N., Dinolfo, M.I., Lang, C.E. 2011. First record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. *Journal of Insect Science* 11:70.
- Poncio, S. Bioatividade de inseticidas botânicos sobre *Microtheca ochroloma* stal (Coleoptera: Chrysomelidae) 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- Pramila Gupta, M., Paul, M.S., Sharma, S.N. 1999. Studies on compatibility of white muscardine fungus *Beauveria bassiana* with some neem products. *Indian Phytopathology* 52(3): 278-280.
- Prestidge, R.A., Zijpp, S. and Badan, D. (1984). Effects of Argentine stem weevil on pastures in Central Volcanic Plateau. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 12:323-331.
- Rabinovitch, L., Cavados, C.F.G., Lima, M.M. 1998. O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou himoficetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Ano III, 6: 9-13.
- Ramakrishnan, R., Suiter, D.R., Nakatsu, C.H., Humber, R.A., Bennett, W. 1999. Imidacloprid-enhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 92 (5): 1125-1132.
- Rodríguez-Lagunes, D.A., A.L. Tejedo, D.R. Diaz, C.R. Maciel, J.V. Mendoza, e.B. Roman, S.R. Colorado & e.P. Velasco. 1997. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y extractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). *Manejo Integrado de Plagas* 44: 14-19.
- Roel, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Interações* (Campo Grande), Campo Grande, v. 1, n. 1, p. 43-50, 2001.
- Rohde, C., Júnior, A.M., Silva, P.K., Ramalho, K.R.O. 2013. Efeito de extratos vegetais aquosos sobre amosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 80 (4): 407-415.
- Rondelli, V.M., Pratisoli, D., Polanczyk, R.A., Maerques, E.J., Sturm, G.M., Tiburcio, M.O. 2011. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 46 (2): 212-214.
- Rosales, H.A.C. Efeito de derivados de meliáceas e isolados de fungos entomopatogênicos sobre o cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). 2001. 143f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Rossi-Zalaf, L.S., S.B. Alves, R.B. Lopes, S. Silveira Neto, M.R. Tanzini. 2008. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In Alves S.B. & R.B. Lopes. Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba, FEALQ, pp. 279-302.
- Sahayaraj, K., Namasivayam, K.S.R., Rathi, J.M. 2011. Compatibility of entomopathogenic fungi with extracts of plants and commercial botanicals. *African Journal of Biotechnology* 10(6): 933-938.
- Samson R.A. 2004. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Systematic and Applied Microbiology* 27:672-680.

- Santiago, G.P., Pádua, L.E.M., Silva, P.R.R., Carvalho, E.M.S., Maia, C.B. 2008. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) mantida em dieta artificial. *Ciência e Agrotecnologia* 32 (3): 792-796.
- Santos, C.A., Passos, A.M.P.R., Andrade, F.C., Camargo, E.A., Estevam, C.S., Santos, M.R.V., Thomazzi, S.M., 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* Tul.(Fabaceae) in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 1077–1083.
- Santos, H.O., Poderoso, J.C.M, Silva-Mann, R., Andrade, T.M., Dantas, P.C., Ribeiro, G.T., Carvalho, M.L.M. 2008. Potencial de repelência do extrato de mamona (*Ricinus comunis* L.) a *Tenebrio molitor* e *Acanthoscelides obtectus*. In: III Congresso Brasileiro de Mamona.
- Santos, L. P., Lima, E. A. L. A. 2011. Ação inseticida de *Beauveria bassiana* e de extratos vegetais no controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Anais do XIX CONIC III CONITI VII JOIC*.
- Silva, F.A.S., Azevedo, C.A.V. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture, 2009, Reno. Proceedings of the 7th World Congress on Computers in Agriculture. St. Joseph: ASABE, 2009. CD-Rom. pp.1-5.
- Spadotto, C. A. Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos. Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Manuel, 10/05/2006. http://www.fmr.edu.br/npi_2.php. 9p.
- Spadotto, C.A.; Gomes, M.A.F.; Luchini, L. C.; Andrea, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).
- Summerell, B. A.; Leslie, J. F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*, 50:135–144.
- Tavares, M.G.C. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* MOTS., 1855 (COL.: Curculionidae). Piracicaba, 2002. 44f. (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Teetor-Barsch GH, Roberts DW. 1983. Entomogenous *Fusarium* species. *Mycopatologia* 84, 3-16.
- Tiago, P. V., Medeiros, L. V., Barbosa, L. F. S., Lopes, R. S., Oliveira, L. G., Costa, A. F., Oliveira, N. T. 2012. Seleção de isolados de *Fusarium lateritium* visando o controle biológico da cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*) em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*). In: XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia - ALAM, 2012, Santos-SP. Anais do XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia - ALAM, 2012.
- Vasantharaj, D.B. 2008. Biotechnological approaches in IPM and their impact on environment. *Journal of Biopesticides* 1(1): 1-5.
- Vieira, P.C. Uso de plantas inseticidas para o controle de formigas cortadeiras. In: Congresso Brasileiro De Entomologia, 16. Salvador, 1997. Resumos. Salvador-BA, 1997. p.10.
- Vieira, R.M., Lima, E.F. 1999. Importância sócio-econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil. In: Queiroz, M.A., Goedert, C.O., Ramos, S.R.R. (Ed.). 1999. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. ISBN: 85-7405-001-6.
- Vitale, S.; Santori, A.; Wajnberg, E.; Castagnone-Sereno, P.; Luongo, L.; Belisario, A. 2011. Morphological and Molecular Analysis of *Fusarium lateritium*, the Cause of Gray Necrosis of Hazelnut Fruit in Italy. *Phytopathology* 101(6): 679-686.

- Warumby, J.F.; Arruda Filho, G.P.; Cavalcanti, V.A.L.B.. Pragas Da Palma. In: Menezes, R.S.C; Simões, D.A.; Sampaio, E.V.S.B (Eds.). A palma no Nordeste do Brasil.1.ed. Recife: UFPE; Editora Universitária, 2005. p.65-80.
- Wang Q, Xu L. 2012. Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. *Molecules* 17: 2367-2377.
- Watanabe, M., Yonezawa, T, Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y, Goto, K., Hara-Kudo, Y. 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11:322.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. editors: PCR protocols. *A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego,CA, pp. 315-322.
- Zeck, W.M. 1992. Synergism between a new insecticide and entomophagous fungi in control of subterranean termites. In: Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, 25., Heidelberg, 1992. Abstracts. Heidelberg: Society For Invertebrate Pathology, 1992. p. 304.