



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

ISABELA JANNE DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS
DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium incarnatum-equiseti* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS VEGETAIS**

RECIFE

2016

ISABELA JANNE DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS
DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium incarnatum-equiseti* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS VEGETAIS**

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 requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Dra. Patricia Vieira Tiago

Co-orientadora: Dra. Mariele Porto Carneiro Leão

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Isabela Janne de

Caracterização molecular e produção de biomassa de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* em diferentes substratos vegetais. / Isabela Janne de Lima - Recife: O Autor, 2016.

50 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Vieira Tiago.

Coorientadora: Mariele Porto Carneiro Leão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências

1. Fungos entomopatogênicos 2. Biomassa 3. Pragas- controle biológico I. Tiago, Patrícia Vieira (orient.) II. Carneiro Leão, Mariele Porto (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-403

ISABELA JANNE DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS
DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium incarnatum-equiseti* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 25/02/2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Patrícia Vieira Tiago (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Félix da Costa
Instituto Agrônômico de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida e iluminou o meu caminho durante esta caminhada; aos meus amados pais e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força e presença em todos os momentos da minha vida

À minha família que me incentivou a correr atrás dos meus objetivos, em especial a meus pais Francisco de Assis e Maria Luciene e ao meu irmão Isaías José, que se fazem presentes em todas as etapas da minha vida.

À minha orientadora Patrícia Vieira Tiago, pela confiança, amizade e conhecimentos passados.

À minha co-orientadora Mariele Porto, pelos ensinamentos em biologia molecular.

A Antônio Félix da Costa, pela amizade e pelo suporte necessário para viabilização desse trabalho.

À minha turma de mestrado, pelas alegrias compartilhadas, em especial a Adriana Ferreira, Hugo Galindo, Diogo Lopes e Ana Emília.

Aos amigos do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos (Ana Carla, Renan, Rafael, Felipe, Ivana, Ewerton, Alexandre, Henrique, Sérgio, Bruno, Vinícios e aos professores Neiva Tinti e Roger Fagner) pelas alegrias, parceria, amizade e ajuda nos momentos de dificuldade.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Micologia pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos Felipe Aroudo, Jéssica Aruã, Marília Menezes, Ricardo Gouveia, Sara Matos, Bia Nogueira, Jamile Lopes, Veruska Cíntia e Eduardo Augusto pela amizade, palavras de conforto e alegrias partilhadas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma durante esta etapa.

RESUMO

A palma forrageira, adaptada ao semiárido nordestino, está sendo ameaçada pela cochonilha do carmim. Para seu combate, uma alternativa é o controle biológico com fungos entomopatogênicos produzidos em escala comercial. Para tanto, necessita-se de um grande número de conídios viáveis. Uma vez aplicada no campo para o controle de insetos, o monitoramento dos fungos pode ser feito com o uso de marcadores moleculares, como o *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Os objetivos deste trabalho foram selecionar substratos potenciais para produção de biomassa de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) induzindo a sua esporulação e germinação e caracterizar estes isolados por meio de marcadores moleculares. Foram utilizados cinco isolados do FIESC 20-b obtidos de *Dactylopius opuntiae* coletados em diferentes municípios de Pernambuco. Para o cultivo dos isolados foram utilizados grãos de arroz, grão de arroz + peptona 1%, quirela de milho, quirela de milho + peptona 1%, quirela de milho + extrato de levedura 1%, farinha de palma forrageira, farinha de palma forrageira + peptona 1%, farelo de trigo, farelo de trigo + peptona 1%, torta de mamona e torta de mamona + peptona 1%. A caracterização molecular foi feita utilizando nove *primers* de ISSR. Dos cinco isolados, os melhores para a produção massal foram URM6779 e URM6782 nos substratos: grãos de arroz, grãos de arroz + peptona (1%), quirela de milho e quirela de milho + peptona (1%). Os isolados selecionados foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo grãos de arroz + fungo e armazenados a 4 e 28°C durante um período de 90 dias. A melhor temperatura de armazenamento foi a 4°C e os conídios permaneceram viáveis até 90 dias. Os fungos mostraram-se eficientes no controle de *D. opuntiae* até 90 dias de armazenamento a 4°C. Dentre os nove *primers* utilizados, dois (M13 e UBC849) diferenciaram os cinco isolados estudados, podendo ser utilizados no monitoramento destes fungos no campo.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos, Controle biológico, palma forrageira.

ABSTRACT

The forage palm, adapted to the northeastern semi-arid, is being threatened by carmine cochineal. For its combat, an alternative is the biological control with entomopathogenic fungi produced in commercial scale. For this, a large number of viable conidia are needed. Once applied in the field for insect control, monitoring of fungi can be done using molecular markers such as the *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). The objectives of this work were to select potential substrates for biomass production of *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) isolates, inducing their sporulation and germination and characterizing these isolates by means of molecular markers. Five FIESC 20-b isolates obtained from *Dactylopius opuntiae* collected in different municipalities of Pernambuco were used. For the cultivation of the isolates were used rice grains, rice grain + 1% peptone, corn kernel, corn kernel + 1% peptone, corn kernel + 1% yeast extract, forage palm meal, forage palm meal + 1% peptone, wheat bran, wheat bran + 1% peptone, castor cake and castor cake + 1% peptone. Molecular characterization was performed using nine ISSR primers. Of the five isolates, the best for mass production were URM6779 and URM6782 on the substrates: rice grains, rice + peptone (1%), corn kernel and corn kernel + peptone (1%). The selected isolates were grown in Erlenmeyer flasks containing rice grains + fungus and stored at 4 and 28 ° C for a period of 90 days. The best storage temperature was 4°C and the conidia remained viable for up to 90 days. The fungi were efficient in controlling *D. opuntiae* up to 90 days of storage at 4°C. Among the nine primers used, two (M13 and UBC849) differentiated the five isolates studied, and could be used to monitor these fungi in the field.

Keywords: Entomopathogenic fungi, Biological control, forage palm.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Número de acesso dos isolados na Micoteca URM e seu respectivo local de coleta.....	25
Tabela 2 - Lista de <i>primers</i> ISSR usados na análise da variabilidade genética dos isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b).....	28
Tabela 3 - Esporulação ($n \times 10^7$ conídios/g de substrato) de isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) em diferentes substratos vegetais.....	32
Tabela 4 - Taxa de germinação (%) de conídios de isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) em diferentes substratos vegetais.....	35
Tabela 5- Esporulação ($n \times 10^7$ conídios/g de substrato) e germinação (%) do isolado URM6779 do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC-20b) em arroz em diferentes temperaturas e tempo de armazenamento.....	37
Tabela 6 - Mortalidade total corrigida (percentual médio \pm E.P.) de <i>Dactylopius opuntiae</i> pelo isolado URM6779 do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) em diferentes tempos de armazenamento e temperaturas.....	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* M13.....39
- Figura 2 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC849.....39
- Figura 3 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC817.....40
- Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC885.....40
- Figura 5 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC888.....41
- Figura 6 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* GACA4.....41
- Figura 7 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC820.....42
- Figura 8 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC851.....42
- Figura 9 - Dendrograma baseado em ISSR de cinco isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* GTG5.....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C Grau Celsius

FIESC *Fusarium incarnatum-equiseti*

G Gramas

IPA Instituto Agrônômico de Pernambuco

ISSR *Inter Simple Sequence Repeats*

mL Mililitro

NTSYSpc *Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

UPGMA *Unweighted Pair Group Method With Arthmetical Average*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	15
2.2. Cochonilha do carmim.....	16
2.3. Controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos.....	17
2.3.1 O gênero <i>Fusarium</i>	18
2.4. Produção de fungos entomopatogênicos em escala comercial.....	19
2.5. Substratos vegetais utilizados na produção de fungos	21
2.5.1 Arroz.....	21
2.5.2. Quirela de milho.....	21
2.5.3 Farinha de palma gigante.....	22
2.5.4 Torta de mamona.....	22
2.5.5 Farelo de trigo.....	22
2.6 Marcador molecular ISRR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>).....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Geral.....	24
3.2. Específicos.....	24
4.PROCEDIMENTO METODOLOGICO.....	25
4.1. Procedência dos isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC).....	25
4.2 Produção dos substratos para a produção de biomassa de isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC).....	25
4.3 Produção e quantificação do inóculo fúngico.....	26
4.4 Efeito dos substratos sobre a germinação e a esporulação de isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC).....	26
4.5 Efeito do substrato selecionado sobre a esporulação e germinação do isolado selecionado do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC) após estocagem em diferentes temperaturas e períodos.....	26
4.6 Avaliação da virulência do isolado selecionado do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC).....	27
4.6.1 Criação de <i>Dactylopius opuntiae</i>	27

4.6.2. Avaliação da eficiência do isolado selecionado no controle de <i>Dactylopius opuntiae</i>	27
4.7 Análises estatísticas.....	27
4.8 Análises de ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>) dos Isolados de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC).....	28
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	30
5.1. Esporulação e germinação de isolados do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b) em diferentes substratos vegetais.....	30
5.2. Esporulação e germinação do isolado URM6779 do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC-20b) em arroz em diferentes temperaturas e tempo de armazenamento.....	36
5.3. Mortalidade de <i>Dactylopius opuntiae</i> frente ao isolado selecionado do complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC 20-b).....	37
5.4. Análise molecular com o marcador ISRR.....	38
6.Considerações finais	44
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

A palma forrageira *Opuntia ficus-indica* (L.) é bem adaptada ao semiárido nordestino (BEZERRA *et al.*, 2014), pois sua morfofisiologia permite que ela tolere a longos períodos de seca (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Sua biomassa é reservatório de água e fibras, por isso, é largamente utilizada na alimentação animal (BEZERRA *et al.*, 2014), porém o aumento desordenado de *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) (cochonilha do carmim) vem ameaçando o seu cultivo, causando prejuízos econômicos.

Para o controle de insetos pragas uma boa alternativa é o controle biológico usando micro-organismos, uma vez que estes são responsáveis por diversas doenças ocorrentes em artrópodes (MACHADO, 2008; GARCIA *et al.*, 2010). Dentre eles, merece destaque os fungos entomopatogênicos, que já tiveram sua eficiência comprovada para diversas espécies de insetos, como os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* e algumas espécies do complexo de *Fusarium incarnatum-equiseti* (ALVES, 1998; ANAND E TIWARY, 2009; O'DONNELL *et al.*, 2012; TIAGO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015).

No controle biológico, utilizando fungos, faz-se necessária a produção de biomassa, sendo interessante, o uso de substratos que sejam de baixo custo, fácil elaboração e eficazes, que possibilitem bom crescimento e esporulação, sendo necessário que haja monitoramento da temperatura, do pH e da luminosidade (KHALIL *et al.*, 1985; LOUREIRO *et al.*, 2003a; PENARIOL *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2009). Além disso, os fatores nutricionais dos substratos selecionados devem ser levados em consideração, pois os fungos necessitam de níveis ideais de fontes de nitrogênio, fósforo e carbono para o estabelecimento de condições favoráveis de crescimento micelial e esporulação (PENARIOL *et al.*, 2008).

Para a produção de biomassa de fungos entomopatogênicos, o substrato mais utilizado tem sido o arroz. Entretanto, desde 1980 tem havido tentativa de substituí-lo por outras fontes, na expectativa de baratear os custos de produção e aumentar a eficiência do processo (OLIVEIRA, 2000; WENZEL *et al.*, 2006; OTTATI-DE-LIMA *et al.*, 2010; SENE *et al.*, 2010). O arroz teve sua eficiência comprovada para *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, enquanto que para outras espécies foi comprovada a eficiência de substratos, como a farinha de milho para *Lecanicillium lecanii* Zare e W. Gams, (FARIA e MAGALHÃES, 2001, WENZEL *et al.*, 2006).

Aplicação no campo pressupõe a produção de biomassa fúngica capaz de produzir grande quantidade de conídios. Por sua vez, o monitoramento da eficiência da sua produção em larga escala e do controle de insetos no campo poderão ocorrer por meio de marcadores

moleculares que sejam capazes de identificar diferenças entre os isolados da mesma espécie fúngica (DNA *fingerprints*). Alguns estudos foram realizados a fim de se detectar o polimorfismo em fungos (TIAGO *et al.*, 2011; VELÁSQUEZ *et al.*, 2007), e estes estudos podem ser realizados por meio de marcadores moleculares, como ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*).

Trabalhos sobre a produção de biomassa de espécies do complexo *F. incarnatum-equiseti* são inexistentes na literatura. Portanto, são necessários estudos relacionados à produção de biomassa de isolados deste complexo de espécies que têm sido eficientes no controle de alguns insetos, incluindo *D. opuntiae*. A seleção de substratos de fácil obtenção e baixo custo auxiliará no emprego deste fungo como bioagente de controle de pragas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

O semiárido brasileiro é uma área que se caracteriza por ter irregularidade e escassez de chuvas, clima seco e solos rasos de média e alta capacidade de fertilidade e de baixa retenção de umidade (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A região ocupa cerca de 10% do território nacional, o que corresponde a cerca de 800 mil Km² (SILVA *et al.*, 2014). Durante a época de estiagem, essas características fazem com que diminua a produtividade de algumas espécies, causando prejuízos econômicos e sociais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Nesse contexto, uma espécie bem adaptada a condições semiáridas é a palma forrageira, *O. ficus-indica*, (BEZERRA *et al.*, 2014), cactácea originária do México, caracterizada por ter porte bem desenvolvido, ser resistente a longos períodos de seca, pois possui suas raízes superficiais, distribuídas de forma horizontal (SILVA E SANTOS, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, sua fisiologia permite que a abertura dos seus estômatos para a captura do gás carbônico ocorra durante a noite, armazenando-o sob a forma de ácido málico, transformando-o durante o dia em moléculas de glicose (RODRIGUES, 2012).

Na região Nordeste o cultivo da palma forrageira gira em torno de 500 mil hectares plantados, dos quais 150 mil em Pernambuco (SANTOS *et al.*, 2006). A espécie é bastante utilizada na alimentação animal, além de ser aproveitado também na dieta humana, na produção de biocombustível, de adesivos, cosméticos, para fins medicinais e substrato para a produção do carmim (BEZERRA *et al.*, 2014).

Os cladódios da palma forrageira **possuem** em média 90% da sua massa composto por água, por isso sua importância nessa região. O fornecimento aos animais, geralmente é na forma de ração nas quais usam outros suprimentos para complementar a dieta, tais como feijão, capim seco, milho, sorgo, silagem e feno, a fim de evitar complicações como diarreia nos animais (SANTOS *et al.*, 2006; SILVA e SANTOS, 2006).

O cultivo dessa espécie está ameaçado devido ao ataque de pragas, dentre elas a cochonilha do carmim, *D. opuntiae*, considerada a mais danosa e que nos últimos 16 anos tem se espalhado pelos estados do Nordeste, causando prejuízos econômicos, principalmente na época seca (LOPES, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2011).

2.2. Cochonilha do carmim

A cochonilha do carmim, *D. opuntiae*, é um inseto de origem mexicana. Seu epíteto específico faz referência ao nome científico da espécie de palma afetada: *Opuntia ficus-indica*. Essa espécie produz o ácido carmínico, usado na produção de um corante natural, o carmim. Nos últimos anos, devido proibição do uso de alguns corantes químicos, que em sua maioria são cancerígenos, estes foram substituído por corantes naturais (SANTOS *et al.*, 2006). O uso do carmim aumentou em torno de 30% (RODRIGUES, 2012).

No Brasil, a palma forrageira foi introduzida no intuito de cultivar a cochonilha do carmim para a produção do ácido carmínico, porém devido às condições climáticas da região o corante produzido não era de boa qualidade, e esse inseto tornou-se uma praga (RODRIGUES, 2012). As palmas forrageiras infestadas pela cochonilha do carmim são de fácil reconhecimento, pois as fêmeas adultas apresentam o corpo pequeno, avermelhado, ovalado, extremidade abdominal arredondada, e são recobertos por uma cerosidade branca (SANTOS *et al.*, 2006). No Brasil, calcula-se que essa espécie já destruiu mais de mil hectares de palma, em maior proporção nos Estados da Paraíba e Pernambuco, e em menor no Ceará e Rio Grande do Norte (LOPES *et al.*, 2009). Recentemente essa espécie foi relatada no norte de Israel, no Vale do Hula, infestando cladódios e frutas de figueira da índia (SPODEK *et al.*, 2014).

A espécie apresenta dimorfismo sexual, o ciclo de vida está sujeito a variações de acordo com a temperatura. Esse inseto possui metamorfose completa, o desenvolvimento pós-embrionário é variável de 40-60 dias. As ninfas migrantes têm em média 0,8 x 0,4 mm e migram pela raquete, geralmente para as bordas, e também são facilmente levadas pelo vento, facilitando sua dispersão (CHIACCHIO, 2008). O desenvolvimento dos machos é dentro dos cáculos, envolvidos por cera, os adultos são alados, e se movimentam até a cópula, depois morrem e as fêmeas são sedentárias (SANTOS *et al.*, 2006).

As fêmeas sugam a seiva dos cladódios da palma inoculando toxinas, dessa forma as plantas enfraquecem, observando-se como sintomas o amarelecimento e a queda das raquetes (CHIACCHIO, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009). Se ocorrer uma grande infestação, haverá morte da planta provocando perdas de até 100% da produção de palma (CHIACCHIO, 2008).

2.3. Controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos

Ao longo dos anos o controle de insetos praga foi feito com o uso de produtos químicos, como os pesticidas, ocasionando poluição ambiental da água, do solo, da atmosfera e também desequilíbrios na população de inimigos naturais da praga e aumento na resistência dos insetos e ácaros aos produtos químicos utilizados (LOPES *et al.*, 2009).

Em contrapartida ao uso de pesticidas químicos, uma alternativa é o controle biológico que proporciona a regulação de plantas e animais por meio da utilização de inimigos naturais como os micro-organismos (fungos, vírus, bactérias e protozoários), que são responsáveis por diversas patologias que acomete os artrópodes (BRITO, 2008; MACHADO *et al.*, 2008; VALICENTE, 2009; GARCIA *et al.*, 2010; DAMIN *et al.*, 2011).

O uso de microrganismos para o controle de artrópodes está crescendo nos últimos anos, isso pode ser observado pelo crescente número de trabalhos na área. Nesse contexto, os fungos são os agentes mais utilizados devido a sua capacidade de supressão de populações de insetos, grande gama de hospedeiros e possibilidade de produção massal (LEITE *et al.*, 2003).

Alguns fungos entomopatogênicos têm ganhado destaque no setor agrícola brasileiro, como *M. anisopliae*, *Sporothrix insectorum* Hoog e Evans e *B. bassiana*, espécies em estudo desde o final do século XIX, e outras menos estudadas, como o uso de espécies do gênero *Fusarium*, como *Fusarium lateritium* Nees (TEETOR-BARSCH e ROBERTS, 1983), *Fusarium proliferatum* Nirenberg (LAZO, 2012) e o complexo de espécies *Fusarium incarnatum-quiseti* (FIESC 20-b) (SANTOS *et al.*, 2015).

Os fungos têm vantagens quando comparados a outros micro-organismos, pois o seu modo de ação é via tegumento, e não via oral, como é mais comum. Estudos sugerem que essa penetração ocorre por ação química, degradação por enzimas (proteases, lipases e quitinases), que causam a histólise e por pressão mecânica (metabolismo do tubo germinativo), provocando uma diminuição gradual do metabolismo do inseto e estes param de se alimentar (ALVES, 1998; VALICENTE, 2009).

Em média, após oito dias da infecção, devido ao crescimento micelial, produção de micotoxinas e a esporulação, ocorre a morte do inseto, causada por ação histolítica, mudanças patológicas na hemocele e bloqueio do aparelho digestivo (ALVES, 1998). No geral, o cadáver fica em posição ereta, com aparência oca ou consistência emborrachada. Os fungos crescem e emergem pelo corpo do inseto, espalhando seus esporos pelo vento, atingindo outros insetos (VALICENTE, 2009).

2.3.1 O gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* apresenta cerca de 775 espécies com distribuição cosmopolita e amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes, habitando o solo, o ar, animais e plantas, ocorrendo sobre plantas ou sobre insetos (ALVES, 1998). O grupo polifilético pertence à família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes e ao filo Ascomycota (MACIEL, 2012). Seus representantes não seguem um padrão para sua classificação, pois existem variações morfológicas (OLIVEIRA E COSTA, 2002). No geral, o método usado para sua identificação morfológica é com base em cultura monospórica em meios de cultura específicos, sendo avaliados a coloração das colônias, o tamanho e a produção de metabólitos secundários (THRANE, 1990).

Esse grupo cresce em meio de cultura apresentando coloração que varia do amarelo ao vermelho (ALVES, 1998). Produzem macroconídios hialinos, geralmente septados, apresentam células basal e apical distintas, e microconídios ovóides e cilíndricos, produzidos sobre fiáides. Clamidósporos podem estar presentes ou ausentes (ALVES, 1998; POLETTO *et al.*, 2006). Há algumas espécies de difícil classificação pela taxonomia clássica, sendo necessário o uso da biologia molecular.

Espécies desse gênero têm sido relatadas como patógenos de insetos. As principais ordens atacadas são Hemiptera, Hymenoptera e Lepdoptera, como *F. lateritium*, que produz uma toxina semelhante à beauvericina (ALVES, 1998) e é controlador de *Phylloxera vitifolia* Fitch (Hemiptera: Phylloxeridae) (TEETOR-BARSCH e ROBERTS, 1983), *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (ANAND E TIWARY, 2009) e *Lopholeucaspis japonica* Cockerell (Hemiptera: Diaspididae) (O'DONNELL *et al.*, 2012). *Fusarium proliferatum*, patogênico ao *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) (LAZO, 2012) e isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) obtidos de *D. opuntiae*, mostrou ser um bom controlador do mesmo (SANTOS *et al.*, 2015). Isolados deste complexo de espécies (FIESC 25-b) também controlaram a vespa da castanha, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) (ADDARIO e TURCHETTI, 2011).

O'DONNELL *et al.* (2009) fizeram um estudo para organizar taxonomicamente espécies pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti*, obtendo dados com base no sequenciamento do fator de alongamento 1 α (TEF-1) (cujas maiores subunidades continham 717 pb para o RNA ribossomal), subunidade maior do RNA ribossomal (LSU rRNA) (1.135 pb), segunda maior subunidade da RNA-polimerase (RPB2) (1766 pb) e

calmodulina (CAM) (704 pb). Das espécies em estudo três receberam nomenclatura binomial com segurança: *F. lacertarum*, *F. scirpi* e *F. equiseti*, as demais precisam de estudos mais detalhados para chegar a sua classificação binomial. Posteriormente, foi realizado um estudo com 190 isolados de diferentes regiões do planeta, sendo 31 deles distribuídos em 15 espécies do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* isolados de espécies de insetos pertencentes a três ordens, a maioria proveniente da ordem Hemiptera (O'DONNELL *et al.*, 2012).

2.4. Produção de fungos entomopatogênicos em escala comercial

A utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico acarreta vantagens devido a sua especificidade ao hospedeiro, baixo custo, segurança ambiental, saúde humana, menor frequência de resistência dos insetos alvo e grande possibilidade de se multiplicar no ambiente, estendendo assim a sua permanência no campo (ALMEIDA, 2007).

Alguns cuidados são exigidos para a utilização de um fungo no controle biológico. A primeira etapa exige o isolamento do inóculo, geralmente obtido do próprio artrópode a ser controlado, pois a maioria é um predador natural. Como o objetivo é eliminar uma grande quantidade de insetos-praga, a segunda preocupação seria a sua produção em escala comercial. E essa última é um fator limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano (SENE *et al.*, 2010).

Para a produção de biomassa de fungos entomopatogênicos, o substrato mais utilizado é o arroz, pela sua riqueza nutricional e facilidade de manipulação. Alguns estudos são realizados na tentativa de substituí-lo por materiais, como o milho, farinha de arroz e soja, farelo de trigo, batata, sorgo e milho, melão, entre outros, com a expectativa de baratear os custos de produção e aumentar a eficiência do processo (OLIVEIRA, 2000; WENZEL *et al.*, 2006; OTTATI-DE-LIMA *et al.*, 2010; SENE *et al.*, 2010).

Os fatores nutricionais dos substratos escolhidos devem ser levados em consideração, pois cada espécie de fungo necessita de níveis ideais de fontes de nitrogênio, fósforo e carbono para o estabelecimento de condições favoráveis de crescimento micelial e esporulação (PENARIOL *et al.*, 2008). Ao meio de cultura escolhido podem-se adicionar outros nutrientes, visando aumentar o crescimento e a esporulação, como o extrato de levedura, uma ótima fonte de nitrogênio, aminoácidos e vitaminas do complexo B (WENZEL *et al.*, 2006). Para um meio balanceado, a relação entre a quantidade de carboidrato e nitrogênio presente deve ser levado em consideração. De acordo com CARLILE E WATKINSON (1994), um meio adequado deve ter uma relação de dez vezes mais carbono do que nitrogênio.

O arroz parboilizado tem sua eficiência comprovada em *M. anisopliae* e *B. bassiana*, controladores de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), mostrando alta esporulação (OTTATI-DE-LIMA *et al.*, 2010). WENZEL *et al.* (2006), estudando a produção de *Lecanicillium lecanii*, obtido da cochonilha verde, *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae), obtiveram boa esporulação em arroz agulhinha e arroz integral e em farinha de milho. Outro substrato eficiente para produção de fungos entomopatogênicos é o farelo de trigo, LOUREIRO *et al.*, (2003a), obtiveram ótimos resultados em estudo com o *Sporothrix insectorum*.

MACHADO *et al.* (2009) obtiveram resultados promissores na produção de *L. lecanii* em milhocina 4%, enquanto que WENZEL *et al.* (2006) conseguiram bons resultados para esporulação em meios de farelo de soja, farelo de trigo, trigo moído e lentilha em grão. Visando a produção em larga escala de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, OTTATI-DE-LIMA (2010) observou que farinha de milho amarela, fubá e trigo moído foram os mais eficientes, contudo, o bagaço da cana-de-açúcar mostrou-se um fraco substrato quando comparado à testemunha (arroz) objetivando a produção dos mesmos fungos (GARCIA *et al.*, 2010).

Sene *et al.* (2010) realizaram testes com *M. anisopliae* e encontraram resultados satisfatórios ao testar um meio de cultivo composto por arroz + resíduo da cervejaria (1:1). OTTATI-DE-LIMA *et al.* (2010), estudando a mesma espécie comprovou que o arroz pode ser substituído pelo fubá e o trigo moído, ambos superaram o arroz na produção de conídios em 6,80% e 12,56%, respectivamente. LOUREIRO *et al.* (2003a), cultivando o *S. insectorum*, fungo usado no controle do percevejo *Leptopharsa heveae* Drake e Poor (Hemiptera: Tingidae), em farelo de trigo enriquecido com extrato de levedura obtiveram excelente esporulação.

Na literatura não existem relatos sobre a produção do gênero *Fusarium* em escala comercial. Porém, como descrito acima, existem vários métodos de bioensaios com resultados positivos para outras espécies, podendo ser adaptados. Para se verificar a eficiência dos substratos na produção de fungos e garantir a durabilidade do produto, alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como: isolados utilizados, unidade de produção, resistência a alterações climáticas, concentração e a viabilidade dos conídios e a mortalidade (total e corrigida). Estes fatores indicarão a qualidade do produto e sua eficiência no controle de seus inimigos naturais durante o período de aplicação e sua persistência no campo (ALVES 1998; SANTORO *et al.*, 2007). Além disso, estas etapas serão importantes para o cálculo final do produto a ser comercializado (ALVES, 1998). Outros fatores que devem ser levados em

consideração são a temperatura e o tempo de armazenamento do produto. LOUREIRO *et al.* (2003b) observaram que ocorreu uma queda na viabilidade dos conídios de *S. insectorum*, cultivado em arroz, após 100 dias de armazenamento em diferentes temperaturas.

2.5. Substratos vegetais utilizados na produção de fungos

2.5.1 Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento bastante difundido na Ásia, tendo sido trazido para o Brasil durante o período de colonização por volta de 1540. De alto valor nutricional, esse alimento é rico em proteínas (7,4%), lipídeos (0,3%) e carboidratos (81,3%) (BASSINELLO e CASTRO, 2004).

Pesquisas no Brasil visando à produção massal de fungos entomopatogênicos tiveram início na década de 60 do século passado e utilizava-se o arroz cozido para produção dos conídios. Após a colonização e crescimento dos fungos a mistura é comercializada, podendo ser vendida na forma de pó molhável (arroz e conídios são triturados) ou sem trituração, nesse caso é necessária à lavagem do substrato com água para remoção dos conídios, que são estruturas infectivas (DALZOTO e UHRY, 2009).

2.5.2. Quirela de Milho

O milho (*Zea Mays* L.) é um cereal largamente cultivado pelo mundo. Devido às suas qualidades nutricionais é utilizado na dieta humana e animal. Rico em amido [principalmente amilose (27%) e amilopectina (73%)], proteína, principalmente a zeína (50% do total existente no grão) e óleos (ácidos graxos, como o palmítico, o esteárico, o oleico, o linoleico e o linolênico). Essa composição varia conforme o tipo de solo, a variedade da semente e o clima da região onde for cultivado (GOES *et al.*, 2013).

Um dos produtos obtidos do milho é a quirela, que, além de milho quebrado, pode conter palha e sabugo triturados, é obtida com teor de umidade próximo à do milho, por esse motivo são feitas a secagem ou a adição de conservantes com tratamentos químicos para que não ocorra perda deste material. O teor de proteína bruta da quirela varia entre 6 e 12% (PIRES *et al.*, 1999).

2.5.3 Farinha de Palma gigante

A palma forrageira (*O. ficus-indica*) (BEZERRA *et al.*, 2014), cactácea originária do México, está bem adaptada ao semiárido brasileiro por ser resistente a longos períodos de seca.

Os cladódios armazenam grande quantidade de água e um bom valor nutritivo com 8,41% de matéria seca, 6,23% de proteína bruta, 3,74% de cálcio e 0,14% de fósforo, importante para a alimentação animal (CÂNDIDO *et al.*, 2005)

A palma pode ser usada como substrato para a produção do carmim ou pode ser processada para ser introduzida na dieta humana por meio de gordura e farinhas, e para produção de biocombustíveis, de adesivos, cosméticos e para fins medicinais (BEZERRA *et al.*, 2014; GALVÃO *et al.*, 2014).

2.5.4 Torta de mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa largamente produzida no Brasil, que depois de industrializada origina a torta e o óleo de mamona (OLIVEIRA, 2005), desse processamento o óleo é destinado à produção de biodiesel (BUENO, 2014).

Depois de processada, a torta de mamona é desintoxicada, e esta possui elevada quantidade de proteína bruta, em torno de 42,5% (CANGEMI *et al.*, 2010). Esses teores permitem que a torta seja usada como componentes na manipulação de rações animal e como biofertilizantes. Com relação ao teor de minerais, ela possui 37,7% de nitrogênio, 16,2% de fósforo, 11,2% de potássio e 64,1% de cálcio (CANGEMI *et al.*, 2010).

Foi observado que o extrato das folhas da mamona (nas concentrações de 5%, 10% e 20%) estimulou a produção de conídios de isolados de *F. incarnatum-equiseti* (SANTOS *et al.*, 2015) sendo a torta de mamona uma possível fonte para a produção de biomassa de isolados desse grupo.

2.5.5 Farelo de trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma gramínea usada como alimento devido ao seu alto valor nutricional, apresentando teores de proteína bruta que varia entre 6 e 22%, de 1-2% de teor lipídico, sendo rico em ácidos graxos insaturados (50% ácido linoléico e 11% ácido oléico). Além disso, o trigo é formado por amido (60-70%), dextrinas, açúcares, celuloses, hemiceluloses e pentosanas (5 a 8%) (ARAÚJO, 2007).

Do processo de industrialização forma-se a farinha de trigo (pela moagem do endosperma) e o farelo de trigo (quando a casca e o embrião são submetidos à pressão transformam-se em partículas menores que posteriormente são peneirados) (WESENDONCK, 2012). Do beneficiamento de uma tonelada de grãos são produzidos 770 kg de farinha e 230 kg de farelo (WESENDONCK, 2012).

2.6 Marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

As técnicas de biologia molecular surgiram há cerca de 30 anos e a cada dia estão sendo mais aprimoradas. Uma das mais usadas é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*), uma metodologia simples da replicação exponencial de fragmentos específicos de DNA por meio da amplificação em ciclos (FUNGARO, 2000). Baseado na técnica de PCR, o ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*), com custo relativamente baixo, é uma técnica rápida e eficiente, pela qual é possível analisar fragmentos que existem entre duas regiões repetitivas (microsatélites) sem a utilização de sequenciamento do DNA (Matioli e Passos-Bueno, 2001). Permite conhecer a diversidade genética a nível inter e intraespecífico (BORNET e BRANCHARD; 2001; REDY *et al.*, 2002).

Dentro de uma mesma espécie, essa técnica permite mostrar a variabilidade genética entre os isolados. CUNHA (2014), analisando a variabilidade genética de *Fusarium oxysporum*, isolados de bananeira utilizou de 14 *primes*, setes deles (UBC834, UBC849, UBC862, UBC864, UBC866, UBC868, UBC881) exibiram bandas de polimorfismo, com cerca de 88,60% de diferenciação entre elas.

Os *primes* (GTG)₅ e (GACA)₄ geraram *fingerprinting* para isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Paz, 2006; Tiago 2011). Poucos são os estudos desses marcadores para monitorar os fungos entomopatogênicos que estão sendo aplicados em campo para o controle biológico, porém é possível traçar um perfil modelo de monitoramento de determinada espécie para verificar a eficiência do seu controle e persistência no campo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Selecionar substratos potenciais para produção de biomassa e conídios de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e caracterizar esses isolados por meio de marcadores moleculares.

3.2. Específicos

- Verificar a produção e taxa de germinação de conídios de isolados do FIESC após crescimento nos substratos de arroz, farinha de milho, farinha de palma e torta de mamona enriquecida e não enriquecidas com extrato de levedura (1%) e peptona (1%);
- Selecionar o substrato mais adequado para produção massal dos isolados FIESC;
- Avaliar a produção e a viabilidade de conídios desses isolados no(s) substrato(s) selecionado(s) após diferentes tempos de estocagem e temperaturas.

4. PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

4.1. Procedência dos isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

Foram utilizados cinco isolados do FIESC 20-b obtidos de adultos de *D. opuntiae*, coletados em diferentes municípios de Pernambuco e preliminarmente selecionados como potenciais agentes de controle biológico da cochonilha do carmim (TIAGO *et al.*, 2012). Os isolados depositados na Micoteca URM possuem os seguintes números de acesso (Tabela 1):

Tabela 1: Número de acesso de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* depositados na Micoteca URM e seu respectivo local de coleta.

Número de acesso	Local de coleta
URM6776	Sertânia
URM6777	Sertânia
URM6778	Tuparetama
URM6779	Ibimirim
URM6782	Arcoverde

4.2 Produção dos substratos para a produção de biomassa de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

Foram utilizados grãos de arroz, grão de arroz + peptona 1%, quirela de milho, quirela de milho + peptona 1%, quirela de milho + extrato de levedura 1%, farinha de palma forrageira, farinha de palma forrageira + peptona 1%, farelo de trigo, farelo de trigo + peptona 1%, torta de mamona e torta de mamona + peptona 1% como substratos para a produção de biomassa dos isolados do FIESC 20-b. As palmas foram coletadas em municípios do Agreste Central e processadas no laboratório de Controle Biológico do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA. Foi feita uma desinfestação com detergente neutro e lavadas com água, em seguida foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas para secar em estufa a 65°C por 144 horas e moídas para a obtenção da farinha. Os demais substratos foram obtidos no comércio. Todos os substratos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 250mL, onde foram depositados 50 g de cada substrato / 25 mL de água destilada. Em alguns tratamentos foi adicionado 0,5g peptona ou de extrato de levedura. Em seguida, foram esterilizados em vapor fluente, por 30 minutos, e autoclavados na temperatura de 121°C por 30 minutos.

4.3 Produção e quantificação do inóculo fúngico

Os isolados do FIESC 20-b foram cultivados em meio Batata Dextrose líquido (BD) e incubados durante dez dias, em BOD ($28 \pm 1^\circ\text{C}$), visando o crescimento vegetativo e a esporulação. Em seguida, os conídios foram contados em câmara de Neubauer para a obtenção de uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL, conforme metodologia utilizada por Alves e Morais (1998).

4.4 Efeito dos substratos sobre a germinação e a esporulação de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

Foram adicionados 5 mL da suspensão de 1×10^7 conídios/mL nos frascos Erlenmeyer contendo os substratos esterilizados. Após 20 dias de crescimento foi realizada a avaliação da esporulação, tomando-se 1g de substrato+fungo ressuspensionado em 5mL de água + Tween (0,01%) de acordo com Alves (1998). O número de conídios foi quantificado em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos em número de conídios/g de substrato.

Para a determinação da taxa de germinação, conídios foram semeados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e, após 13 horas de incubação, foi realizada a contagem de conídios germinados e não germinados, a fim de se verificar a porcentagem de germinação.

Foram realizados cinco bioensaios separadamente, cada um contendo um isolado. O delineamento foi inteiramente casualizado, com onze tratamentos (substratos) e três repetições.

4.5 Efeito do substrato selecionado sobre a esporulação e germinação do isolado selecionado do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) após estocagem em diferentes temperaturas e períodos

O isolado URM6779 do FIESC 20-b foi cultivado em arroz conforme item 4.4. Após 20 dias, o substrato selecionado foi estocado a 28°C e 4°C , por 0, 15, 30, 60 e 90 dias. Após cada período, foram avaliadas a germinação e a esporulação do isolado, conforme metodologia descrita no item 4.4. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2×5), sendo duas temperaturas e cinco tempos de estocagem, com três repetições.

4.6 Avaliação da virulência do isolado selecionado do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

4.6.1 Criação de *Dactylopius opuntiae*

A criação do inseto ocorreu em casa de vegetação no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Cladódios de palma sadios, conduzidos periodicamente do Agreste Central (PE) para a sede do IPA, foram lavados com detergente neutro, secos e infestados com ninfas de *D. opuntiae*. Após 20 dias, os cladódios infestados por fêmeas adultas de *D. opuntiae* foram utilizados nos experimentos.

4.6.2. Avaliação da eficiência do isolado selecionado no controle de *Dactylopius opuntiae*

As palmas infestadas com *D. opuntiae* foram conduzidas ao Laboratório de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Micologia da UFPE, as quais foram pulverizadas com uma solução detergente (0,02%) com o intuito de diminuir a quantidade de cera e aumentar a superfície de contato do inseto com o fungo. Após a secagem, os cladódios foram pulverizados com 4 mL de uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL do isolado URM6779 do FIESC 20-b e o controle foi pulverizada com água destilada esterilizada + Tween 80 (0,01%). Após, os cladódios foram armazenados em recipientes de plástico com tampa vedada por tecido e mantidos a $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por dez dias. Este procedimento foi realizado após cada temperatura (28°C e 4°C) e tempo de estocagem (0, 15, 30, 60 e 90 dias).

A avaliação da mortalidade total foi realizada no décimo dia de instalação do bioensaio, por meio da contagem de 50 insetos para cada repetição. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 5), sendo duas temperaturas e cinco tempos de estocagem, com três repetições. A partir da mortalidade total foi calculada a mortalidade corrigida com o uso da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de insetos vivos no controle} - \text{número de instos vivos no tratamento}}{\text{Número de insetos vivo no controle}} \times 100$$

4.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação das médias utilizou-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.5 beta (SILVA E AZEVEDO 2009).

4.8 Análises de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) dos Isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

As reações de amplificação foram feitas utilizando os seguintes componentes de reação em um volume final de 25 µL: tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂, 1,5 mM, dNTP 0,25 mM, primers (tabela 2), 0,25 mM, Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen Life Technologies) e 25 ng de DNA. A amplificação foi conduzida utilizando-se um termociclador (Techne®) com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 93°C por 5 minutos (1 ciclo), 93°C por 20 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por um minuto 30 segundos (40 ciclos) e extensão final a 72°C por seis minutos (1 ciclo). Para o iniciador M13, as reações foram feitas utilizando os seguintes componentes em um volume final de 25 µL: tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂, 2,0 mM, dNTP 0,25 mM, iniciador M13 0,5 mM, Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen Life Technologies) e 25 ng de DNA. A amplificação foi conduzida utilizando a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto 30 segundos (35 ciclos) e extensão final a 72°C por 5 minutos (1 ciclo).

Tabela 2 - *Primers* ISSR usados na análise da variabilidade genética dos isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b)

Primers UBC	Sequência (5' 3')
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
820	GTG TGT GTG TGT GTG TC
849	GTGTGTGTGTGTGTGTGTYA
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
GACA4	GACA GACA GACA GACA
GTG5	GTG GTG GTG GTG GTG
M13	GTAAAACGACGGCCAGT

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), a três V/cm de distância entre os eletrodos, em tampão de corrida 1X TAE (pH 8,0), utilizando marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen Life Technologies). O gel foi corado com gel red, visualizado em transiluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital.

Os dados obtidos com o marcador ISSR foram analisados pelo programa NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) segundo ROHLF (2000) e foram introduzidos na forma de variáveis binárias para construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard. A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado

um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*), quando também foi calculada a matriz cofenética.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1. Esporulação e germinação de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) em diferentes substratos vegetais.

Para o isolado URM6776 o melhor substrato foi à quirela de milho, acrescida de peptona (1%) ($8,16 \times 10^7$ conídios/g substrato) e para o isolado URM6777 foi a quirela de milho, acrescida de extrato de levedura (1%) ($61,66 \times 10^7$ conídios/g substrato). Estes dois substratos foram eficientes na produção de conídios do isolado URM6778 ($13,33 \times 10^7$ e 22×10^7 conídios/g substrato, respectivamente), assim como o farelo de trigo acrescido de peptona (1%) (17×10^7 conídios/g substrato). O isolado URM6779 teve resultados expressivos em arroz (363×10^7 conídios/g substrato), arroz com peptona (1%) (260×10^7 conídios/g substrato), quirela de milho (289×10^7 conídios/g substrato), quirela de milho com peptona (1%) ($245,66 \times 10^7$ conídios/g substrato) e farelo de trigo (239×10^7 conídios/g substrato). Os maiores valores de esporulação do isolado URM6782 foram em quirela de milho ($286,66 \times 10^7$ conídios/g substrato), quirela de milho com peptona (1%) ($176,66 \times 10^7$ conídios/g substrato) e farelo de trigo com peptona (1%) ($281,33 \times 10^7$ conídios/g substrato). A diferença estatística entre os tratamentos utilizados para a produção de conídios dos isolados do FIESC 20-b pode ser acompanhado na tabela 3.

Estudos realizados com *Bipolaris euphorbiae* (Hansf.) J.J. Muchovej & A.O. Carvalho, um fungo controlador do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), mostrou boa esporulação em arroz ($2,9 \times 10^6$ conídios/g substrato), quirela de milho ($3,5 \times 10^6$ conídios/g substrato) e farelo de trigo ($8,1 \times 10^6$ conídios/g substrato), os quais não diferiram entre si (PENARIOL *et al.*, 2008).

WENZEL (2006) estudando a produção de dois isolados de *L. lecanii* (JAB02 e JAB45), observou que a melhor esporulação foi em farelo de trigo com $19,30 \times 10^7$ conídios/g substrato e $13,16 \times 10^7$ conídios/g substrato, respectivamente. No estudo realizado por MACHADO *et al.* (2009) foi observado um aumento na esporulação de *L. lecanii* quando adicionado milhocina 4% na quirela de milho. LOUREIRO *et al.* (2003a), produzindo *S. insectorum* em farelo de trigo enriquecido com extrato de levedura obtiverem esporulação $1,0 \times 10^8$ conídios/g. Os adicionais usados fornecem uma boa quantidade de nitrogênio que perfazem as necessidades desses isolados, uma vez que o meio adequado deve conter uma relação de dez vezes mais carbono do que nitrogênio (CARLILE e WATKINSON, 1994).

OTTATI-DE-LIMA *et al.* (2010), testando substratos para produção de fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae*, IBCB 425, observou que os melhores substratos foram o arroz e a canjiquinha, com valores de esporulação de $2,4 \times 10^8$ conídios/g substrato e $1,34 \times 10^8$ conídios/g de substrato, respectivamente.

SENE *et al.* (2010) ao realizarem testes com *M. anisopliae*, obtiveram $11,3 \times 10^8$ conídios/g em meio de arroz + resíduo de cervejaria (1:1) e em arroz polido, $9,6 \times 10^8$ conídios/g de substrato. LOUREIRO *et al* (2005) estudando os diferentes isolados de *M. anisopliae* cultivados em arroz durante 10 dias sob fotofase de 12 horas, observaram rendimentos de $2,08 \times 10^8$; $1,75 \times 10^8$; $2,22 \times 10^8$ e $2,30 \times 10^8$ conídios/grama de arroz, respectivamente.

Os substratos tortos de mamona e farinha de palma, com e sem o acréscimo de peptona (1%), não estimularam a produção de conídios dos isolados estudados.

Tabela 3: Esporulação ($n \times 10^7$ conídios/g de substrato) de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) em diferentes substratos

Isolado	Arroz	Arroz ¹	Quirela de milho	Quirela de milho ¹	Quirela de milho ²	Torta de mamona	Torta de mamona ¹	Farinha de Palma	Farinha de Palma ¹	Farelo de trigo	Farelo de trigo ¹
URM 6776	0.79 c (±0,14)	1.25 bc (±0,22)	0.20 c (±0,07)	8.16 a (±1,28)	0.30c ± 0,24	0.00 c (±0)	0.00c (±0)	0.00c (±0)	0.00 c (±0)	2.21 b (±0,49)	0.00 c (±0)
URM 6777	0.90 b (0,15)	1.19 b (±0,25)	3.42 b (±1,83)	4.03 b (±1,67)	61.66 a (±28,11)	0.00 b (±0)	0.00 b (±0)	0.00 b (±0)	0.61 b (±0,39)	0.90 b (±0,15)	24.26 b (±20,55)
URM 6778	8.50bcd (±2,14)	5.33 cd (±1,15)	9.33 bcd (±5,13)	13.33 abc (±2,88)	22.00 a (±4,58)	0.00 d (±0)	0.00 d (±0)	0.00 d (±0)	0.00 d (±0)	11.33 bc (±1,15)	17.00 ab (±4,35)
URM 6779	363.00a (± 27,83)	260.00a (±58,92)	289.0a (±84,03)	245.66 ab (±58,65)	65.66 bc (±18,20)	0.00 c (±0)	0.00 c (±0)	0.00 c (±0)	0.00 c (±0)	239.00 ab (± 46,89)	41.33 c (±12,20)
URM 6782	10.00 cd (±1)	2.80 cd (±0,4)	286,66a (±43,09)	176.66 ab (±28,55)	139.33 bc (±27,50)	0.00 d (±0)	0.00 d (±0)	0.00 d (±0)	0.00 d	170.33 bc (±31,65)	281.33 a (±43,09)

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

1- Peptona (1%)

2- Extrato de levedura (1%)

Os conídios produzidos pelos isolados do FIESC 20-b nos substratos em estudo mostraram-se viáveis, com exceção para a torta de mamona e farinha de palma com e sem peptona (1%) (Tabela 4). Os conídios dos isolado URM6776 apresentou alta taxa de germinação dos conídios em arroz (100%) e em arroz acrescido de peptona (1%) (97,8%). Os substratos quirela de milho acrescido de peptona (1%), e farelo de trigo foram os substratos de destaque para a germinação dos conídios dos isolados URM6777 e URM6782, com valores que variaram entre 96,3 e 100%. O arroz, com e sem peptona, quirela de milho com peptona (1%) e farelo de trigo, com e sem peptona (1%), foram os substratos em que foram observados valores de germinação entre 96,1 e 100% para os isolados URM6778 e URM6779.

Além da produção de conídios, os substratos utilizados para a produção massal de fungos deverão garantir a viabilidade dos mesmos para que o produto obtido seja eficiente no controle do inseto alvo. Os substratos utilizados neste estudo, como o arroz, quirela de milho e farelo de trigo, também foram apresentados por outros autores como eficientes na manutenção da viabilidade de conídios de várias espécies de fungos utilizados no controle biológico (LOUREIRO *et al.*, 2005; OTTATI-DE-LIMA, 2010; PENARIOL *et al.*, 2008; WENZEL, 2006). Os valores de viabilidade podem variar conforme a espécie fúngica e substratos utilizados. OTTATI-DE-LIMA *et al.* (2010) e LOUREIRO *et al.* (2005) observaram altas taxas de germinação de conídios (acima de 94%) de *M. anisopliae* após cultivado em arroz, enquanto WENZEL (2006) em pesquisa realizada com *L. lecanii* encontrou germinação de 85% em quirela de milho. Testes realizados com canjica de milho e ácido cítrico mostraram uma viabilidade de 94% de conídios germinados para *M. anisopliae*, 87% para *Isaria fumosorosea* Wize, 72% para *S. insectorum* e 64% para *B. bassiana* (SILVA *et al.*, 2012). Essa variação nos valores de viabilidade dos conídios também foi observada para *L. lecanii* em que 73% dos conídios estavam viáveis (WENZEL, 2006) e para *M. anisopliae* e *B. bassiana* que apresentaram valores de viabilidade de 99,08% e 95,5%, respectivamente, após cultivo em farelo de milho (OTTATI-DE-LIMA *et al.*, 2010).

O isolado URM6779 apresentou altas taxas de esporulação e germinação em arroz e tanto o isolado quanto o substrato foram selecionados para o estudo relacionado à temperatura e ao tempo de armazenamento do fungo.

Tabela 4: Taxa de germinação (%) de conídios de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) em diferentes substratos vegetais

Isolado	Arroz	Arroz ¹	Quirela de Milho	Quirela de milho ¹	Quirela de milho ²	Torta de mamona	Torta de mamona ¹	Farinha de Palma	Farinha de Palma ¹	Farelo de trigo	Farelo de trigo ¹
URM 6776	100.0 a (±0)	97.8 a (±2,56)	45.3 c (±1,04)	19.5 e (±1,80)	55.0 b (±1)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	37.6 d (±2,56)	0.0 f (±0)
URM 6777	69.0 c (±1,80)	22.5 e (±2,5)	64.1 c (±3,81)	99.6 a (±0,57)	31.8 d (±2,75)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	88.3 b (±2,08)	98.8 a (±1,25)	98.8 a (±1,25)
URM 6778	100.0 a (±0)	98.3 a (±2,08)	93.1 b (±0,57)	100.0 a (±0)	97.8 a (±1,04)	0.0 c (±0)	0.0 c (±0)	0.0c (±0)	0.0 c (±0)	100.0 a (±0)	100.0 a (±0)
URM 6779	100.0a (±0)	96.1 ab (±0,28)	98.0 ab (±2,64)	100.0 a (±0)	94.8 c (±0,28)	0.0 d (±0)	0.0 d (±0)	0.0 d (±0)	0.0 d (±0)	100.0 a (±0)	99.6 a (±0,57)
URM 6782	28.3 e (±3,81)	67.3 c (±2,46)	31.8 e (±3,05)	100.0 a (±0)	38.6 d (±3,21)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	0.0 f (±0)	96.3 ab (±1,52)	92.0 b (±1,00)

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

1- Peptona (1%)

2- Extrato de levedura (1%)

5.2. Esporulação e germinação do isolado URM6779 do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC-20b) em arroz em diferentes temperaturas e tempo de armazenamento.

O isolado URM6779 foi inoculado em arroz e incubado em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 20 dias. Após esse período, os frascos contendo grãos de arroz + fungo foram armazenados a 4 e a 28°C durante um período de 90 dias, em diferentes espaços temporais.

No tempo zero de armazenamento, o isolado apresentou esporulação de $63,92 \times 10^7$ conídios/g de substrato e 100% de germinação (Tabela 5). Foi observada uma redução na esporulação conforme o aumento de dias de armazenamento nas duas temperaturas estudadas, sendo que a 4°C a redução foi mais drástica após 60 dias enquanto que a 28°C essa redução ocorreu após 30 dias. Não foi observada a produção de conídios do isolado após 60 e 90 dias de armazenamento a 28°C . Aos 15 e 30 dias de armazenamento ocorreu redução no número de conídios nos frascos armazenados a 4°C e a 28°C , sendo 4°C a melhor temperatura. Quanto à viabilidade dos conídios, estes apresentaram altas taxas de germinação na temperatura de 4°C após 60 dias de armazenamento, o mesmo sendo observado a 28°C , porém só até 30 dias, reduzindo em seguida. Após 60 dias os conídios estocados a 28°C não apresentaram viabilidade. O isolado URM6779 armazenado a 4°C apresentou melhor esporulação e viabilidade ao longo do tempo.

LOUREIRO *et al.* (2003b), realizando testes de armazenamento em duas temperaturas (4°C e 26°C) e tempo de armazenamento com *S. insectorum* cultivados em arroz, também observaram que 4°C foi a temperatura que garantiu maior viabilidade dos conídios após 80 dias de armazenamento (69%). Outro estudo com o isolado ESALQ447 de *B. bassiana*, cultivado em arroz, demonstrou que o processo de armazenamento do fungo em freezer ($-7 \pm 1^{\circ}\text{C}$) garantiu 100% de viabilidade dos conídios durante 80 meses (Marques *et al.*, 2000).

Tabela 5: Esporulação ($n \times 10^7$ conídios/g de substrato) e germinação (%) do isolado URM6779 do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC-20b) em arroz em diferentes temperaturas e tempo de armazenamento.

Temperatura Tempo	Esporulação		Germinação	
	4°	28°C	4°	28°C
0	63,92Aa ($\pm 4,80$)	63,92aA($\pm 4,80$)	100 aA (± 0)	100 aA (± 0)
15	49,58 bA ($\pm 4,01$)	33,33 Bb ($\pm 3,60$)	100 aA(± 0)	100 aA (± 0)
30	25,87 Ca ($\pm 4,01$)	7,3 cB($\pm 0,79$)	100 aA (± 0)	98,66 aB($\pm 1,15$)
60	1,75 dA ($\pm 0,15$)	0,0 cA (± 0)	99 aA(± 1)	0 bB (± 0)
90	0,05 dA ($\pm 0,003$)	0,0 cA (± 0)	95,33 bA($\pm 1,15$)	0 bB (± 0)

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

5.3. Mortalidade de *Dactylopius opuntiae* frente ao isolado selecionado do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b)

O isolado URM6779 mostrou ser um bom controlador de *D. opuntiae* após o armazenamento, principalmente a 4°C (Tabela 6). O armazenamento por 15 dias a 4°C apresentou a maior taxa de mortalidade corrigida (89,06%), ocorrendo uma diminuição dessas taxas nos demais tempos analisados, não sendo observadas diferenças entre as taxas de mortalidade após 30 (77,38%) e 60 dias (74,37%). Quanto ao armazenamento a 28°C, foram observadas diferenças nas taxas de mortalidade corrigida após 15 (92,45%) e 30 dias (76,66%). Após 60 dias de estocagem, os ensaios de mortalidade a 28°C foram encerrados devido a não esporulação do isolado nessas condições. Não ocorreu diferença entre a mortalidade corrigida do isolado URM6779 após 15 e 30 dias de estocagem a 4 e 28°C.

Testes realizados com isolados *B. bassiana*, *I. fumosorosea* e *M. anisopliae*, cultivados em canjica e armazenados a 26°C durante 15 dias, com 12 horas de fotofase, mostraram um controle de praticamente 100% do percevejo-de-renda (*L. hevea*) (SILVA *et al*, 2012). Para o mesmo inseto, *Isaria farinosa* Holmskiold foi testada como agente controlador e obteve 98% de mortalidade confirmada e *S. insectorum* foi testado e mostrou uma mortalidade confirmada de aproximadamente 90% (SILVA *et al*, 2012).

MARQUES *et al* (2000), testaram a virulência de *B. bassiana* contra *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae), cultivado em arroz e armazenadas em

freezer ($-7 \pm 1^\circ\text{C}$) e obtiveram inicialmente 92% de mortalidade e, após 80 dias foi observado 94% de mortalidade.

Tabela 6: Mortalidade total corrigida (percentual médio \pm E.P.) de *Dactylopius opuntiae* pelo isolado URM6779 do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) em diferentes tempos de armazenamento e temperaturas.

Tempo	Temperatura	Mortalidade corrigida	
		4°	28°C
15		89,06 \pm 2,24 aA	92,45 \pm 1,22aA
30		77,38 \pm 3,14 bA	76,66 \pm 3,81bA
60		74,37 \pm 3,15 bA	0 \pm 0 cB
90		63,92 \pm 1,73 cA	0 \pm 0 cB

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

5.4. Análise molecular com o marcador ISSR

Dentre os primers utilizados (M13 e UBC849) foram capazes de diferenciaram os cinco isolados estudados (Figuras 1 e 2). Os primers UBC817, UBC820, UBC885, UBC888 e GACA4 diferenciaram três dos cinco isolados (figuras 3, 4, 5, 6 e 7), enquanto UBC851 e o GTG5 diferenciaram apenas dois isolados (Figuras 8 e 9). Embora estes últimos primers não tenham diferenciado todos os isolados, para aqueles em que foram obtidos um perfil de bandas específicas, estas apresentaram pequena ou nenhuma similaridade genética com relação aos demais isolados. Nenhuma similaridade genética foi observada para os isolados URM6776, URM 6777 e URM 6778, utilizando o primer UBC885; para URM6779 utilizando UBC817; e URM6776 com o primer UBC888.

O monitoramento do controle biológico de insetos no campo pode ser realizado por meio de marcadores moleculares que sejam capazes de diferenciar os isolados da mesma espécie fúngica (DNA *fingerprints*). Alguns estudos foram realizados a fim de se detectar o polimorfismo em fungos (TIAGO *et al.*, 2011; VELÁSQUEZ *et al.*, 2007) utilizando ISSR, porém, não existem relatos da utilização deste marcador para monitoramento de fungos no campo.

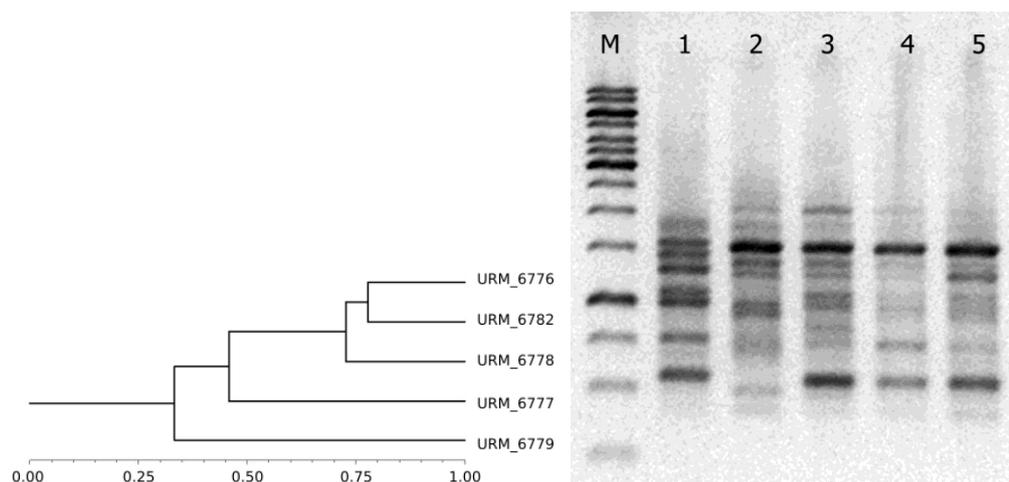


Figura 1: Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* M13.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

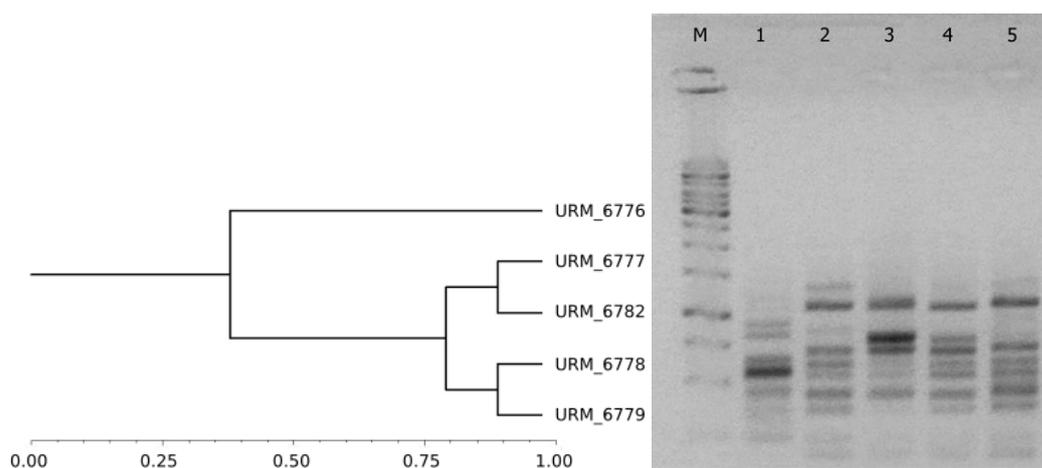


Figura 2: Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC849.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

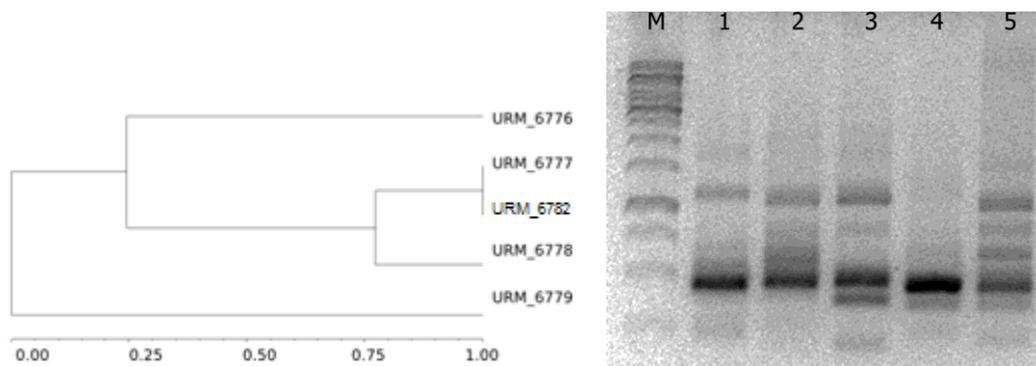


Figura 3: Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC817.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

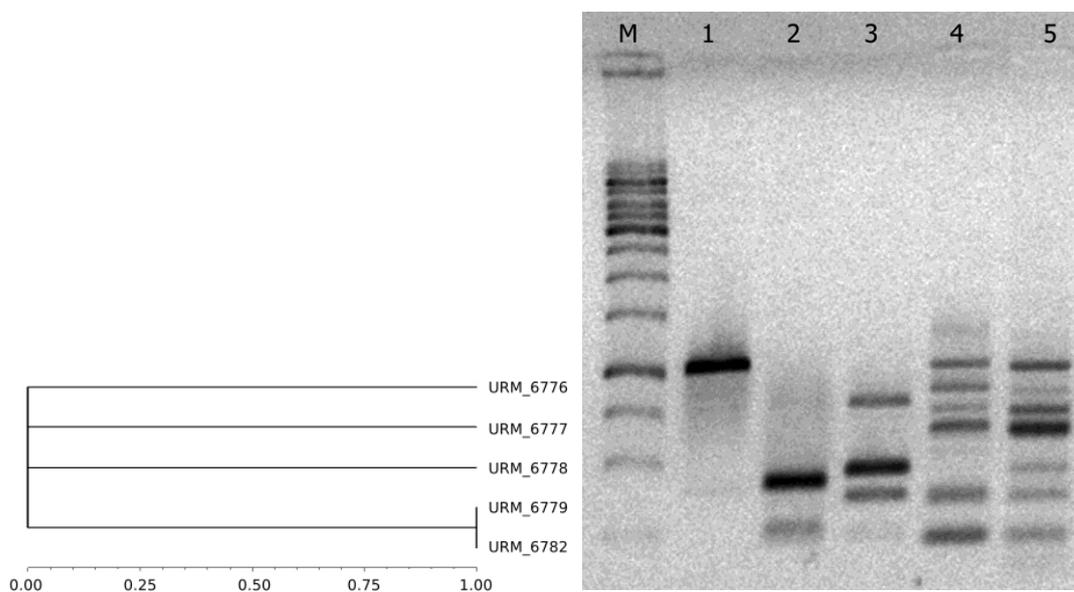


Figura 4: Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC885.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

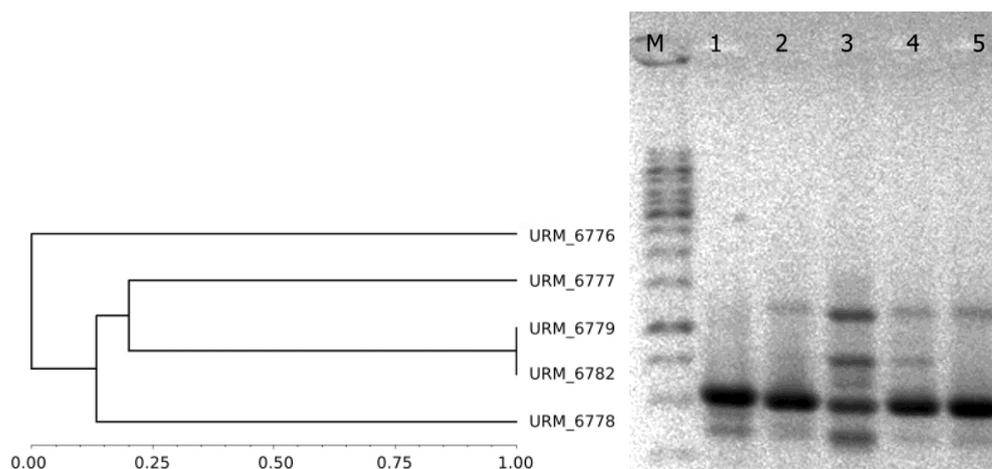


Figura 5 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC888.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

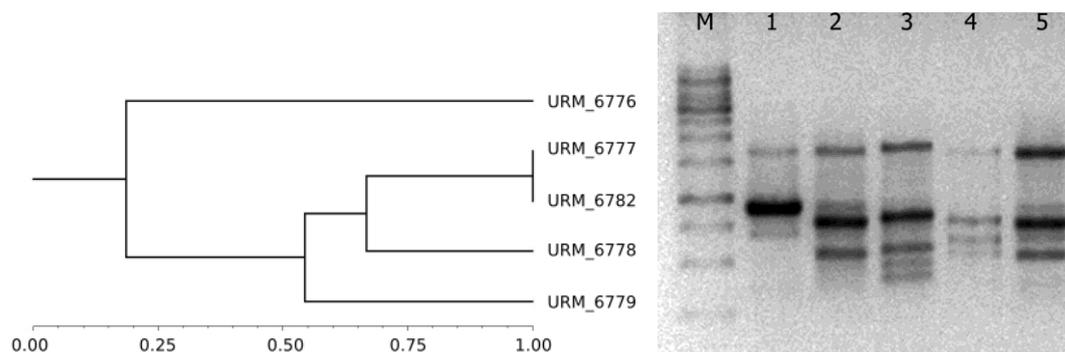


Figura 6 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* GACA4.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

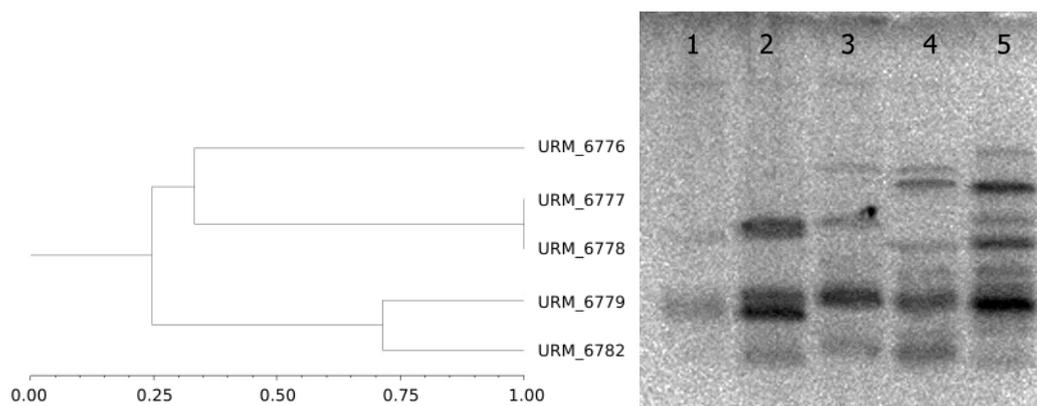


Figura 7 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC820.

1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

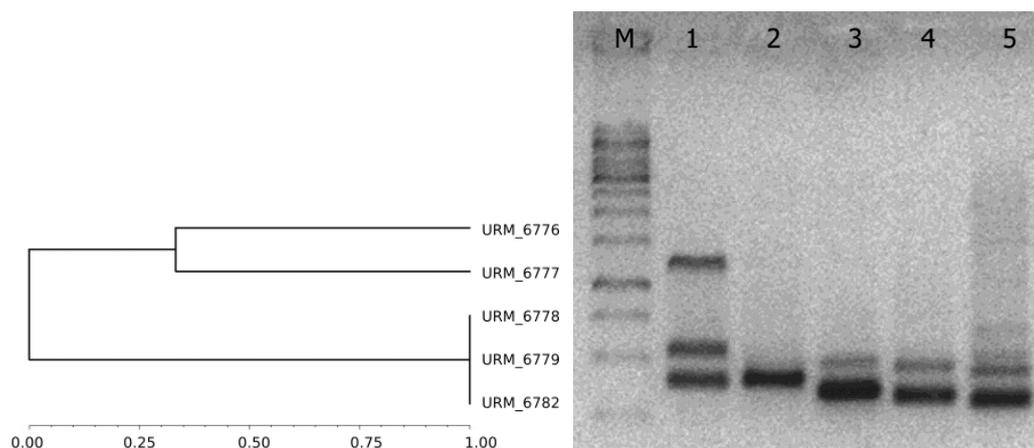


Figura 8 - Dendrograma de similaridade genética de isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC 20-b) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* UBC851.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

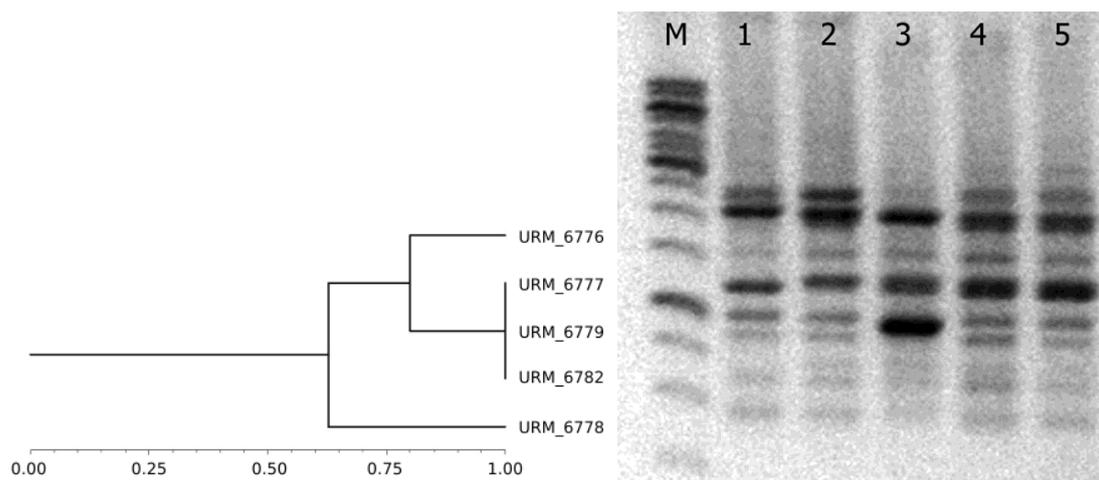


Figura 9 - Dendrograma baseado em ISSR de cinco isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e perfis de amplificação a partir dos produtos de amplificação utilizando o *primer* GTG5.

M=marcador; 1= URM 6776; 2= URM 6777; 3= URM 6778; 4= URM 6779; 5= URM 6782

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo permitiram concluir que:

- Os melhores isolados para a produção massal são o URM6779 e o URM6782;
- Arroz, quirela de milho e farelo de trigo, com ou sem peptona (1%), são bons substratos para a produção massal de isolados FIESC 20-b;
- A melhor temperatura de armazenamento foi de 4°C, mantendo a esporulação, viabilidade dos conídios do isolado URM6779 e sua eficiência no controle da cochonilha até 90 dias;
- Os primer M13 e UBC849 podem ser utilizados para o monitoramento da eficiência de controle dos isolados FIESC 20-b no campo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.A. et al. Problemas fitossanitários causados pela cochonilha do camim a palma forrageira no Cariri Ocidental Paraibano. **Revista verde**, v.6, p.98-108, 2011.
- ALMEIDA, J.E.M.; ROCHA, T.C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. **Arquivos do Instituto biológico**, v.74, n.4, p.369-371, 2007.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 289-371, 1998.
- ALVES, S.B.; MORAIS, S.A. 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. **Controle Microbiano de Insetos**, v., 23, p. 765-777, 1998.
- ANAND, R.; TIWARY, B.N. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to eggs and larvae of *Spodoptera litura*, the common cutworm. **Biocontrol Science and Tecnology**, v.19, p.919-929, 2009.
- ARAÚJO, W.A.G. Alimentos energéticos alternativos para suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, n1, p.384-394, 2007.
- BASSINELLO, P.Z.; CASTRO, E.M. Arroz como alimento. **Informe agropecuário**, v.25, n.222, p. 101-108, 2004.
- BEZERRA, B.G. et al. Zoneamento agroclimático da palma forrageira (*Opuntia* sp.) para o estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**.v.18, n.7, p.755-761, 2014.
- BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Report*, Athens, v. 19, p. 209-215, 2001.
- BRITO, C. H. et al. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-docarmim na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, n.2, p.1-5, 2008.
- BUENO, C.F.D., et al. Torta de mamona destoxificada para alimentação de poedeiras comerciais. **Revista Rural**.v.44, n.3, p. 538-543, 2014.
- CÂNDIDO, M. J. D.; CAVALCANTE, A. C. R.; NEIVA, J. N. M. **Do campus para o campo: Tecnologias para produção de ovinos e caprinos**. Gráfica Nacional, p. 1-128, 2005.
- CANGEMI, J.M., A revolução verde da mamona. **Química nova na escola**, v.32, n.1,p.3-8, 2010.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. The fungi, **San Diego academic**.p. 1-428p, 1994.
- CHIACCHIO, F. P. B. Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. **Bahia Agrícola**, v.8, n.

2,p.12-14, 2008.

CUNHA, C.M.S. Caracterização genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* e desenvolvimento de um marcador SCAR para identificação de suscetibilidade ao mal do panamá da bananeira. Tese do Programa de recursos genéticos – Universidade Federal do Paraná, 2014.

DALZOTO, P.R.; UHRY,K.F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL. **Biológico**, v.71, n.1. p. 37-41, 2009.

DAMIN,S. et al. Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium* sp. **Revista Acadêmica de Ciências Agrária Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 41-49, 2011.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.22, p.18-21, 2001.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.12-16, 2000.

GALVÃO JÚNIOR, J. G.B. et al. Forrageira na alimentação de ruminantes:cultivo e utilização. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.2, p.78-85, 2014.

GARCIA, C.; SCHAMNE, P. A.; ROHDE, C. Avaliação do bagaço da cana-de-açúcar como substrato para produção do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In: *XIX EncontroAnual de Iniciação Científica*. Guarapuava. Anais... Guarapuava: XIX do EAIC UNICENTRO, 2010.

GOES, R. H. T.B.; SILVA, L.H.X.; SUZA, K.A. Alimentos e alimentação animal. **UFGD**, 2013.

KHALIL, S.K.; SHAN, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.13, p. 329-334, 1985.

LAZO, M. L. S. R. Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (hemiptera: thaumastocoridae). Dissertação de mestrado, p. 78, 2012.

LEITE, L.G. et al. Produção de fungos entomopatogênicos. **Ribeirão Preto: Livrocere**s, p. 1-92, 2003.

LOPES, E.B. et al. Velocidade de infestação e dispersão de *dactylopius opuntiae* cockerell, 1896 em palma gigante na paraíba. **Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 1, p. 196-205, 2009.

LOUREIRO, E.S., Subsídios para a produção de *Sporothrix insectorum* (HOOG & EVANS). **Bioikos**, v.17, p.81-86, 2003a.

LOUREIRO, E.S. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanava fimbriolata* (Stal, 1854). **Arquivos do Instituto biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p.469-472, 2005.

- LOUREIRO, E.S. et al. Viabilidade de conídios e blastósporos de *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans) armazenados em diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.89-9, 2003b.
- MACHADO, A. C. R. Produção de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos, sólidos e combinados em sistema bifásico de cultivo. **Dissertação de mestrado**. p. 1-64, 2008.
- MACHADO, A. C. R. et al. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. **Bragantia**, v.68, p.703-714, 2009.
- MACIEL, C. G. *Fusarium sambucinu* associado a sementes de *Pinus elliottii*: Paogñiidade, morfologia, filogenia molecular e controle. Dissertação de Engenharia Florestal- Universidade federal de Santa Maria, p. 1-93, 2012.
- MARQUES, J.E.; ALVES, S. B.; MARQUES, I.M.R. Virulência da *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. A *Diatracea saccharalis* (F) (Lepdoptera: Cambidae) Após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n 2. p. 303-307, 2000.
- MATIOLI, S.R., PASSOS-BUENO, M.R.S. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: Matioli, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, p. 153-161, 2001.
- O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic diversity of insecticolous *Fusaria* inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLSTL. **Mycologia**, v. 104, p.427-445, 2012.
- O'DONNELL, K. et al. 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**, v.47, n.12, p.3851-3861, 2009.
- OLIVEIRA, F. T. et al. Palma forrageira: Adaptação e importância para os ecossistemas Árido e Semi-Árido. **Revista verde Mossoró**, v.4, n.5, p.27-37, 2010.
- OLIVEIRA, I. P. Potenciais da mamona (*Ricinus communis* L.) na Região Centro - Oeste brasileira - **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**. v.1, n..2, p.104 -130, 2005.
- OLIVEIRA, S. M. C. Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p.45, 2000.
- OLIVEIRA, V.C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ardra) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *Glycines*. **Revista de Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.6, p.631-634, 2002.

OTTATI-DE-LIMA, E.L. et al. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto biológico**, v.77, p.651-659, 2010.

PAZ, F.B Ação patogênica de linhagens de *Beauveria bassiana* sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), análise genética (PCR) e compatibilidade com inseticidas químicos. Tese de doutorado em Biologia de Fungos – UFPE, 2006.

PENARIOL, M. C., et al. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, v.67, p.805-814, 2008.

PIRES, A. J. V. et al. Amonização da Quirera de Milho com Alta Umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.6, p.1186-1193, 1999.

POLETTI, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, n. 128, p. 9-17, 2002.

RODRIGUES R. A. N. cochonilha vale ouro: narrativas cromáticas do carmim. Dissertação (Mestrado em Arte) – Universidade de Brasília, **Instituto de Artes, Departamento de Artes Visuais**, p.1-154, 2012.

ROHLF, F.J. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Manual. **Applied Biostatistics**. Inc. New York, 2000.

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

SANTOS, A.C. S. et al. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. **Jornal of Pest Science**, v. 89, p-539-547, 2015.

SANTOS, D. C. et al. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. **IPA Documentos**, 30 p. 48p. 2006.

SENE, L.ET AL. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. **Arquivos do Instituto biológico**, v.77, p.449-456, 2010.

SILVA, C.C.F., SANTOS,L.C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus- Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletronica de Veterinária**, v.2, n.10, p.1-13, 2006.

SILVA, E.A.R. et al. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae). **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v.79, n.4, p.549-556, 2012.

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, Reno. **Proceedings of the 7th World Congress on Computers in Agriculture**. St. Joseph: ASABE., CD-Rom. p.1-5, 2009.

SILVA, L. M. et al. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.44, n.11, p.2064-2071, 2014.

SPODEK, M. et al. First recordo *Dactylopius onpuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) from Israel. **Phytoparrasitica**, v.45, p. 377-379, 2014.

TEETOR-BARSCH, G. H.; ROBERTS, D. W. Entomogenous *Fusarium* species. **Mycopatologia**, v.84, p.3-16,1983.

THRANE, U. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. **Journal Microbiologic Methods**, v.12, p.23-39, 1990.

TIAGO, P., V. ET AL. 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.

TIAGO, P.V. et al. Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intron markers. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.1565-1575, 2011.

VALICENTE, F. H. Controle Biológico de pragas como entomopatógenos. **Informe Agropecuário**. v.30, n.251, p. 48-55, 2009.

VASCONCELOS, A. G. V., et al. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). **Revista brasileira de zootecnia**, v.38, n.5, p.827-831, 2009.

VELÁSQUEZ, V.B. et al. Intraspecific differentiation of chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 89-99, 2007.

WENZEL, I. M.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G.T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, v.34, p.7 – 14, 2006.

WESENDONCK, W. R. Valor nutricional e energia metabolizável de subprodutos do trigo utilizados para alimentação de suínos em crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 2, p. 203-210, 2012.