

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE  
DA COCHONILHA-DO-CARMIM

*Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)

**ELIANE SOUZA GOMES BRITO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

FEVEREIRO DE 2011

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE  
DA COCHONILHA-DO-CARMIM

*Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)

**ELIANE SOUZA GOMES BRITO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do título  
de Doutor em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ  
FEVEREIRO DE 2011

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE  
DA COCHONILHA-DO-CARMIM

*Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)

ELIANE SOUZA GOMES BRITO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do título  
de Doutor em Produção Vegetal.”

Aprovada em 22 de fevereiro de 2011.

Comissão Examinadora:

---

Carlos Alberto Tuão Gava (D.Sc. – Produção Vegetal) – EMBRAPA

---

Milton Erthal Jr (D.Sc. – Produção Vegetal) – UENF

---

Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc. – Produção Vegetal) – UENF

---

Prof. Richard Ian Samuels (PhD. – Patologia de Insetos) – UENF  
(Orientador)

Ao meu esposo Aroldo, pela compreensão nos muitos momentos de ausência e apoio nas dificuldades, além da dedicação e empenho na superação de muitas delas durante todos esses anos;

Aos amigos Ernando, Michelly, Tamires, pela dedicação nos vários finais de semana de árduo trabalho, pelo ótimo humor mesmo no desconforto das noites de vigília às formigas no campo, pelas boas gargalhadas e também pelas lágrimas derramadas, enfim pelos bons e maus momentos vividos durante a realização deste trabalho.

**Dedico esse trabalho**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por mais esta conquista;

Ao meu esposo, Aroldo, pela cumplicidade, cooperação e carinho em tantos momentos difíceis;

Aos meus pais, José e Maria Amélia; aos meus irmãos, Flávio, Leandro e Gustavo por compreenderem minha ausência nos momentos de dor vividos por nossa família ao longo desses anos e ainda assim me incentivando a continuar;

Ao professor Richard Ian Samuels, pela orientação, compreensão e paciência;

Ao pesquisador Carlos Alberto Tuão Gava, pelo apoio, orientação e amizade;

Aos amigos do LCB/EMBRAPA, Ernando, Michelly, Rose, Tamires, Márcia, Herbert, Gizélia, Cida, Carliana, Emeson, Carol e Paula pelos ótimos momentos, pela cumplicidade, o bom humor sempre presente e o auxílio nos trabalhos;

Aos amigos do LEF, Rita, Milton, Denise, Paulo César, Adriano, Laerciana, Cátia, Arli e César Ronald, por todos os momentos compartilhados durante a realização de parte deste trabalho;

Aos amigos do CTD, pela acolhida;

Aos amigos do IF Sertão pela colaboração na conclusão deste trabalho;

A UENF, pela oportunidade de realizar o curso;

A CAPES pela concessão da bolsa;

A EMBRAPA, pelo apoio na realização do projeto;

A FACEPE pelo apoio financeiro para realização dos trabalhos;

Ao IPA, pela concessão de espaço físico, assistência e colaboração;

Aos amigos produtores que tão gentilmente colaboraram com a realização dos trabalhos de campo;

A todos os servidores da UENF, EMBRAPA e IPA pelos valiosos serviços prestados, pelo convívio e amizade.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1- Principais pragas da cultura da palma forrageira no nordeste brasileiro .....	2
2.2- Cochonilha de escama <i>Diaspis echinocacti</i> (Bouché, 1833).....	2
2.3- COCHONILHA-DO-CARMIM: Espécies do gênero <i>Dactylopius</i> .....	3
2.4 – Relação custo benefício entre o cultivo de palma forrageira e/ou corante carmim .....	5
2.5 – Métodos de controle.....	6
2.5.1 – Surfactantes .....	6
2.5.2 – Controle cultural .....	7
2.5.3 – Vigilância sanitária e combate cochonilha-do-carmim ( <i>D. opuntiae</i> ).....	7
2.5.4 - Inimigos naturais de <i>Dactylopius opuntiae</i> no Brasil.....	7
2.5.5 – Controle biológico clássico de <i>Dactilopius opuntiae</i> .....	8
2.6. Uso de Fungos Entomopatogênicos contra <i>Dactilopius opuntiae</i> .....	9
2.6.1 - Interações fungo-hospedeiro .....	10
2.6.2- Enzimas degradadoras da cutícula.....	11
2.6.3. Papel das proteases no processo de infecção do hospedeiro .....	13
2.6.4. Atividade de Lipases .....	14
2.6.5. Interação fungo- hospedeiro- ambiente.....	15
2.6.6. MicoInseticidas no cenário brasileiro.....	18
2.7. Interações entre Formigas e Hemíptera: Sternorrhyncha .....	20
3. TRABALHOS .....	24
PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA <i>Dactylopius opuntiae</i> (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE).....	24
Resumo.....	24
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	29

Bioensaio 1- Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos a <i>Dactylopius opuntiae</i> em condições de laboratório e campo .....	29
Bioensaio 2- Avaliação da virulência de isolados a <i>Dactylopius opuntiae</i> em condições de laboratório .....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
Bioensaio 1 – Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a <i>Dactylopius opuntiae</i> em condições de laboratório e campo.....	32
Bioensaio 2- Avaliação da virulência de isolados a <i>Dactylopius opuntiae</i> em condições de laboratório .....	35
CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	41
FATORES AMBIENTAIS E CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS EM RELAÇÃO À VIRULÊNCIA A <i>D. opuntiae</i> .....	48
RESUMO .....	48
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
Bioensaio 1 - Tolerância dos fungos testados sobre a cochonilha do carmim, a radiação solar e ultravioleta artificial .....	59
Tabela 1. Descrição dos tratamentos para avaliação da tolerância dos fungos testados sobre a cochonilha do carmim, a radiação solar e ultravioleta artificial .....	60
Bioensaio 2 - Efeito da temperatura na germinação dos fungos entomopatogênicos testados sobre a cochonilha do carmim.....	63
Bioensaio 3 - Produção de protease e lipases pelos fungos entomopatogênicos testados sobre <i>d. Opuntiae</i> .....	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
Bioensaio 1 - Tolerância dos fungos testados sobre a cochonilha do carmim, a radiação solar e ultravioleta artificial .....	65
Bioensaio 2 - Efeito da temperatura na germinação dos fungos entomopatogênicos testados sobre a cochonilha do carmim.....	71
BIOENSAIO 3 - PRODUÇÃO DE PROTEASE E LIPASES PELOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNCOS TESTADOS SOBRE <i>D. opuntiae</i> .....	74
CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO .....	87
INTRODUÇÃO .....	90
1. Levantamentos de mirmecofauna no bioma caatinga .....	90
2. Associação entre formigas e hemípteros (Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha) .....	91
3. Formigas como agentes de controle biológico .....	92
MATERIAIS E MÉTODOS .....	93
1. Levantamento de espécies de formigas presentes nas áreas de palma forrageira infestadas com <i>D. opuntiae</i> .....	93
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	96
CONCLUSÕES .....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	107
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109



## RESUMO

BRITO, Eliane Souza Gomes, Dsc. ; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2011. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle da cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae*, (Hemiptera:Dactylopiidae). Orientador: Prof. Richard Ian Samuels. Co-orientador: Pesq. Carlos Alberto Tuão Gava.

O controle da cochonilha-do-carmim, *Dactylopius opuntiae* é um grande desafio para os produtores de palma forrageira no semi-árido brasileiro. O presente estudo aborda o uso de fungos entomopatogênicos como possíveis agentes de controle biológico para *D. opuntiae*. Os ensaios foram realizados em condições de campo e de laboratório simultaneamente, avaliando o potencial de isolados de fungos entomopatogênicos sobre as fases de ninfa e fêmeas adultas. Foram testados isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces sp.*, *Lecanicilium lecanii* e dois isolados provenientes de epizootias naturais, *Fusarium sp.* e *Cladosporium sp.* Em laboratório e campo a aplicação do inóculo foi efetuada de forma direta ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conídios/ mL) combinado com óleo vegetal (8%) sobre fêmeas adultas e ninfas. Isolados provenientes de epizootias naturais não demonstraram patogenicidade a nenhuma das fases de desenvolvimento de *D. opuntiae*. No laboratório, dentre os 26 isolados de fungos testados, 12 foram patogênicos a fêmeas adultas e 14 a ninfas. A concentração mais efetiva sobre ambas as fases foi  $1 \times 10^9$ , no entanto somente os isolados CG24 e LBC 55 diferiram significativamente entre as concentrações sobre fêmeas adultas,  $DL_{50} 9,03 \times 10^8$  e  $2,26 \times 10^7$  respectivamente. Os melhores resultados de

DL<sub>50</sub> obtidos contra ninfas foram: LPP19 ( $1,83 \times 10^3$ ), CG24 ( $6,21 \times 10^3$ ) e LCB55 ( $3,85 \times 10^6$ ). Todos os isolados testados, foram sensíveis à radiação natural, no entanto os isolados LCB55 e LCB62 apresentaram respectivamente 83,9% e 15,4% de germinação após 48 h de incubação. Os isolados com maior tolerância a diferentes temperaturas foram LCB61 e LCB62 apresentando respectivamente 88,28% e 35,15% de germinação aos 30°C, porém aos 35°C somente o isolado LCB61 foi tolerante com 85,24% de germinação. Estudos sobre atividade enzimática mostraram que os níveis mais elevados de atividade de tripsina foram associados com isolado LCB53. Cinco atividades proteolíticas foram visualizadas com diferentes massas moleculares usando géis de atividade SDS-PAGE. Os isolados LPP19 e LCB55 expressaram duas principais proteases de elevada massa molecular, embora com menor atividade global que LCB53. Quanto aos isolados LCB52 e LCB62 apenas demonstraram atividade traço "em gel". No entanto, atividade de lipase foi detectada apenas em filtrados da cultura de LCB62 e LCB55 quando utilizado azeite como substrato. O estudo da mirmecofauna presente nas áreas de palma forrageira infestadas por *D. opuntiae*, realizado por meio de armadilhas do tipo "Pit-fall" e armadilhas contendo atrativos alimentares (sardinha e goiabada), revelou a presença de 28 espécies de formigas nas áreas infestadas. No município de Sertânia, a espécie mais abundante foi *Creumatogaster sp.* (1825 exemplares), seguida das espécies *Brachimymex pictus* (808 exemplares), O município de Dormentes também apresentou abundância de espécies, *Dorymymex sp.1* (1329 exemplares) e *Pheidole sp.4* (865 exemplares). O município de Serrita, no entanto apresentou como mais abundantes as espécies *Camponotus sp.* (542 exemplares), *Pheidole sp. 4* (356 exemplares) e *Solenopsis sp.* (188 exemplares). Estudos mais detalhados sobre o padrão de predação de *D. opuntiae* pelas espécies de formigas amostradas poderiam revelar mais claramente seu potencial no controle biológico desta praga.

## ABSTRACT

BRITO, Eliane Souza Gomes, DSc. ; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2011. Evaluation of entomopathogenic fungi for the control of scale insect *Dactylopius opuntiae*, (Hemiptera:Dactylopiidae). Adviser: Prof. Dr. Richard Ian Samuels. Co-adviser: Dr. Carlos Alberto Tuão Gava.

The control of the scale insect, *Dactylopius opuntiae*, is a great challenge in the production of cactus in the semi-arid regions of Brazil. The present study investigated the possible use of entomopathogenic fungi as biological control agents of *D. opuntiae*. The tests were carried out under laboratory and field conditions simultaneously, evaluating the potential of a range of isolates entomopathogenic fungi on the nymphs and adult females. Isolates of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* sp., *Lecanicilium lecanii* and two isolates from naturally occurring epizootics, *Fusarium* sp. and *Cladosporium* sp. In the laboratory and field, applications of conidia were carried out by direct application ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conidios / mL) combined with vegetable oil (8%) against adult females and nymphs. Isolates from natural epizootics were not pathogenic to any of the developmental phases of *D. opuntiae*. In the laboratory, among the 26 isolates tested, 12 were pathogenic to adult females and 14 to nymphs. The most effective concentration against both phases was  $1 \times 10^9$ , however only isolate CG24 and LBC 55 differed significantly among the concentrations against adult females, the  $DL_{50}$  was  $9.03 \times 10^8$  and  $2.26 \times 10^7$ , respectively. The best results for  $DL_{50}$  obtained against nymphs were: LPP19 ( $1.83 \times 10^3$ ), CG24 ( $6.21 \times 10^3$ ) and LCB55 ( $3.85 \times 10^6$ ). All the isolate tested were sensitive to natural radiation, however isolate LCB55 and LCB62 presented 83.% and 15.% germination, respectively after 48 h incubation. The isolates with greater tolerance to different temperatures were LCB61 and LCB62 presenting 88.28% and 35.15% germination respectively at 30°C, however at 35°C only the isolate LCB61 was tolerant with 85.24% germination. Studies of the enzymatic activity showed that the highest levels of trypsin activity were associated with isolate LCB53. Five proteolytic activities were visualized with different molecular masses using SDS-PAGE activity gels. Isolates LPP19 and LCB55 expressed two major proteases with high molecular mass, although with lower global activity than LCB53. LCB52 and LCB62 had trace activity "in gel". However, lipase activity was

only detected in culture filtrates of LCB62 and LCB55 when using olive oil as substrate. The study of the mirmecofauna present in the areas of cactus palm infested with *D. opuntiae*, monitored using "Pit-fall" traps and traps containing food baits (sardine and jam), demonstrated the presence of 28 species of ants in the infested areas. In the district of Sertânia, the most abundant species was *Crematogaster* sp (1825 samples), followed by *Brachymyrmex pictus* (808 samples). The district of Dormentes also showed an abundance of species, *Dorymyrmex* sp.1 (1329 samples) and *Pheidole* sp.4 (865 samples). However in the district of Serrita, *Camponotus* sp. (542 samples), *Pheidole* sp. 4 (356 samples) and *Solenopsis* sp. (188 samples) were the most abundant species. More detailed studies on the pattern of predation of *D. opuntiae* by the species of ants sampled could reveal their potential as possible biological control of this pest.

## 1. INTRODUÇÃO

O semi-árido brasileiro ocupa 86% da região Nordeste e caracteriza-se por apresentar um período chuvoso, no qual as pastagens são abundantes e de boa qualidade nutritiva, todavia, na época da seca ocorre uma redução na capacidade de suporte das mesmas, em virtude da baixa disponibilidade e comprometimento da qualidade da forragem, decorrente de sua lignificação (Araújo Filho et al., 1998).

A pecuária está entre as principais atividades agrícolas desenvolvidas nas regiões semi-áridas nordestinas. A região Nordeste do Brasil apresenta um rebanho bovino de 25.966.000 cabeças, 9.331.000 ovinos e 8.712.000 caprinos, representando 13,0 %, 58,0 %, e 93,0 % do rebanho brasileiro, respectivamente (IBGE, 2004). A estacionalidade da produção de forragens é um fator limitante da produção animal, presente em quase todas as regiões agropastoris do Brasil e, mais acentuada na Região Nordeste, devido à irregularidade de distribuição das chuvas, sendo necessário buscar alternativas para a alimentação do rebanho (Lima et al., 2004; Lopes et al., 2007).

A palma forrageira, introduzida na região do Semi-Árido Nordestino no século XIX (Silva & Santos, 2006) ocupa atualmente uma área de 550.000 ha, constitui-se a base da alimentação dos rebanhos caprinos, ovinos e bovinos, sendo indispensável nas cadeias produtoras de leite e carne da região. A palma forrageira, além do seu valor energético na dieta dos rebanhos contribui com níveis de carboidratos não fibrosos em torno de 61.79% (Wanderley et al., 2002), elevados teores de sais minerais e participando em até 40% da matéria seca consumida. Outro fator relevante é a grande quantidade de água acumulada nos seus cladódios, detalhe que não pode ser esquecido por contribuir no fornecimento de água aos animais durante o período seco do ano (Santos et al., 1997).

A cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae*, uma praga de elevado potencial biótico tem dizimado as áreas de cultivo de palma forrageira (*Opuntia ficusindica* Mill) há aproximadamente 13 anos. As cultivares mais plantadas no Semi-Árido têm apresentado infestações alarmantes desta praga. Os ataques ocorrem no período seco do ano e são muito intensos. O enfraquecimento das plantas decorrente do ataque, associado à ocorrência de patógenos, causa perdas que podem chegar a 100%. O manejo desta praga não tem sido eficaz e os custos elevados o inviabiliza. Atualmente há cerca de 112 municípios afetados pela praga, considerada A2 pelo MAPA, levando os produtores a venderem os seus rebanhos e abandonar suas terras para sobreviver nas periferias das cidades (Araújo, 2005).

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Principais pragas da cultura da palma forrageira no nordeste brasileiro

Na região nordeste do Brasil as pragas que ocorrem com maior frequência e causam danos significativos a palma forrageira são as cochonilhas *Diaspis echinocacti* (Bouché, 1833) (Hemiptera: Diaspididae), conhecidas vulgarmente por cochonilha de escama, piolho ou mofo da palma e a *Dactylopius opuntia* (Hemiptera: Dactylopidae) conhecida vulgarmente por “lêndea branca” ou cochonilha-do-carmim.

### 2.2- Cochonilha de escama *Diaspis echinocacti* (Bouché, 1833)

O primeiro registro da Cochonilha de escama *Diaspis echinocacti* na região Nordeste foi em 1966, no município de São Bento do Una, no estado de

Pernambuco. Atualmente se encontra nos estados, Pernambuco, Paraíba, e Ceará (Santos et al., 2006).

A medida de controle mais eficaz é a prevenção de infestações através da obtenção de material propagativo idôneo, livre da praga e em casos de áreas já formadas onde ocorre infestação deve-se proceder com a destruição do foco, queimando plantas infestadas (Silva, 1990; Warumby et al., 1993).

Segundo Santos et al., (2006), dentre as espécies de inimigos naturais da cochonilha de escama se destacam: *Plagiomerus cyaneus* (Hymenoptera, Encyrtidae), *Prospaltella aurantii* (Hymenoptera, Aphelinidae), ambos parasitóides e as principais espécies de predadores são: *Coccidophilus citricola*, *Chilocorus nigrita*, *Zagreus bimaculosus*, *Pentilia egena*, *Pentilia sp.*, *Zagloba beautimonti*, *Zagloba sp.* e *Calloeneis sp* todas pertencentes à ordem Coleóptera, família Coccinellidae, além de uma espécie de Diptera da família Syrphidae, *Salpingogaster conopida*.

### **2.3- Cochonilha-do-carmim: Espécies do gênero *Dactylopius***

Outra praga que vem preocupando os produtores de palma forrageira é a cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* Cockerel, 1899 (Hemiptera: Sternorrhyncha: Dactylopiidae), mundialmente conhecida por produzir o carmim, um importante corante largamente utilizado pela indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, têxtil entre outros setores (Rodriguez e Niemeyer 2000; Mendez-Gallegos et al., 2003; Portillo 2005). Este inseto é uma praga específica das espécies de cactáceas *Opuntia sp.* e *Nopalea*, sendo *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill seu hospedeiro preferencial. Estima-se que esta praga tenha atingido aproximadamente 20 % da área de palma plantada no semi-árido brasileiro, acumulando um prejuízo de cerca de R\$ 140 milhões (Lopes et al., 2001; Bahe, 2007).

Dentre as espécies do gênero *Dactylopius* tem-se, *D. tomentosus* Lamark 1801, *D. confusus* Cockerell 1893 e *D. opuntiae* Cockerell 1896 ; *D. ceylonicus* Green 1896 , *D. confertus* De Lotto 1974, *D. austrinus* De Lotto 1974, *D.*

*salmianus* De Lotto 1974, *D. zimmermanni* De Lotto 1974 e *D. coccus* Costa 1829 (Rodriguez et. al., 2001; Portillo 2005). No entanto, a espécie *Dactylopius coccus* é considerada a mais produtiva em termos de exploração comercial de carmim, sendo popularmente conhecida como “grana fina” e as demais como silvestres (Diodato et al., 2004).

Das espécies do gênero *Dactylopius* conhecidas três são citadas no Quarto Catálogo dos Insetos que vivem nas plantas do Brasil (Silva et al., 1968), sendo nativas no território nacional, *D. ceylonicus*, *D. indicus* e *D. subterraneus*. Existem relatos de Domingues (1963) e Correia (1984), citados por Santos et al., (2006) de que a cochonilha encontrada nas cactáceas da Caatinga no Sertão Nordeste foi trazida para o Brasil pelos portugueses na época da colonização, juntamente com as cactáceas exóticas para criação e produção do corante natural. Constam na literatura ainda registros de infestação de áreas na Austrália a partir do Brasil por volta de 1788, levada pelos ingleses junto com a *Opuntia vulgaris*, visando à produção de carmim, então dominada pela Espanha (Julien e Griffiths, 1998). Entretanto, até o final do século passado nunca houve relatos de infestações tão catastróficas como atualmente se vê em plantios de palma nos estados de Pernambuco e Paraíba.

Evidências levam a crer que há uma diversidade de espécies do gênero *Dactylopius* presentes nas áreas infestadas da região Nordeste, alguns autores relatam variações comportamentais e morfológicas nas populações analisadas (Passos, 2007; Lopes, 2001; Carvalho, 2007). A princípio acreditava-se que a população predominante de cochonilhas era de *D. ceylonicus*, sendo mais tarde confirmada como *D. opuntiae* (Lopes, 2007).

Segundo Arruda e Cavalcante (2000), espécies do gênero *Dactylopius* ocorrem naturalmente nas caatingas nordestinas, vivendo sobre palmas nativas principalmente nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba.



## **2.4 – Relação custo benefício entre o cultivo de palma forrageira e/ou corante carmim**

Conforme divulgado pelo Sebrae (2005), a extração de carmim no sertão nordestino poderia ser uma oportunidade de negócios. Com base nos dados contidos no site, o uso do carmim teria uma tendência de crescimento em nível mundial, uma vez que este corante vem sendo largamente utilizado, principalmente na indústria de alimentos, presente na maioria das gelatinas e iogurtes vermelhos, no sorvete de morango e até em embutidos de carne, movimentando anualmente no mundo cerca de US\$ 75 milhões.

De acordo com dados fornecidos pela Emepa, a cotação do carmim é controlada por uma instituição criada para este fim denominada Organización Mundial de la Cochinilla y el Carmin. O preço médio girava em torno de US\$ 18,00 /kg de cochonilha seca, matéria-prima para extração do ácido carmínico (produto comercial). O preço atualmente gira em torno de US\$80,00 a US\$ 100,00 dependendo da oferta. Segundo Lopes et al (2001), no período de exploração de carmim em Sertânia/PE, a empresa Firace – Corantes Naturais, então estabelecida na região, oferecia R\$2,5/Kg de cochonilha seca, muito abaixo do valor cotado internacionalmente. Além disso, a espécie predominante na região, *D. opuntiae* é pouco comercial, pois seu rendimento de ácido carmínico é muito inferior ao da espécie *D. coccus*, comumente cultivada nos países onde se têm tradição em produzir carmim. Todos estes fatores inviabilizaram a extração de carmim nesta região.

Considerando que a região é tradicionalmente produtora de palma forrageira, sendo inclusive cultivada em pequenas propriedades para ser comercializada nos períodos de escassez de chuvas, chegando a custar cerca de R\$ 100,00 e 200,00 a tonelada, com uma produção média de 100 toneladas por hectare. Comparativamente a produção de cochonilha seca em um hectare de palma é em média de 400 Kg, a qual era comercializada por R\$ 2,50/ Kg, resultando em um faturamento de R\$ 1000,00. Com base nestes dados é possível concluir que na realidade do Sertão Nordeste é mais rentável produzir

palma. Ao considerar ainda a voracidade da espécie de cochonilha estabelecida nesta região, a adoção de medidas de combate desta praga tem caráter de urgência, pois vem exterminando todas as áreas de palma, principal fonte de alimento para os rebanhos bovinos, caprinos, ovinos durante as secas prolongadas do Nordeste (Lopes et al., 2008; Silva et al., 2007).

## **2.5 – Métodos de controle**

### **2.5.1 – Surfactantes**

Inúmeras tentativas de controle vêm sendo testadas visando conter a infestação e disseminação de *D. opuntiae*. Foram realizados ensaios com produtos alternativos como sabão e detergente neutro para o controle de *D. opuntiae*, mas segundo Carvalho (2007) este método é pouco funcional por apresentar algumas limitações, principalmente pelo alto custo.

A concentração recomendada de sabão ou de detergente neutro é 2 a 5%, considerando um preço médio de R\$5,00 Kg<sup>-1</sup> e R\$4,00 L<sup>-1</sup>, respectivamente, para uma quantidade de 400 g (mL)/ bomba de 20 L . Em uma área com baixa densidade de plantas (25.000 ha<sup>-1</sup>), com uma altura média de 1,6 a 2,0 m com aplicação com cobertura de toda a planta em ambos os lados o consumo médio é de 1.6000 litros de calda. Considerando ainda que as populações mais elevadas da praga ocorrem em plena época de escassez de água, que neste período chega a custar em média R\$ 75,00 m<sup>3</sup> acrescido do valor dos produtos entre R\$ 160,00 a R\$ 128,00 e ainda somado à mão-de-obra para aplicação que custa em torno de R\$ 60,00 por aplicador por dia (pelo menos 4 aplicadores ha) totalizando R\$308,00 a R\$ 348,00 por aplicação, recomenda-se que se façam em média sete pulverizações por ano, sendo assim o custo total de um controle alternativo para *D. opuntiae* custaria ao produtor entre R\$ 2.156,00 a R\$ 2.436,00 aproximadamente. Enquanto que um hectare de palma custa em média para

venda direta entre R\$ 2.000,00 a R\$ 3.000,00 e a produção é bianual (Gava, comunicação pessoal).

### **2.5.2 – Controle cultural**

Outras medidas foram recomendadas para tentar controlar *D. opuntiae* dentre tais como controle cultural, o qual consiste na aquisição de material vegetal (palma) oriundo de regiões onde a praga não ocorre, eliminação dos primeiros focos, realizar o raleio em plantios adensados para facilitar a eliminação da praga e a destruição de plantios de palma abandonados com focos de *D. opuntiae*.

### **2.5.3 – Vigilância sanitária e combate cochonilha-do-carmim (*D. opuntiae*)**

Medidas legais também foram adotadas por meio da vigilância sanitária, impedindo o trânsito de material considerado infestado ou oriundo de locais infestados (plantas e animais) para áreas consideradas livres de *D. opuntiae*.

Com a Instrução Normativa nº 52 de 20 de Novembro de 2007 foi estabelecida a lista de pragas quarentenárias ausentes no território nacional denominada A1 e pragas quarentenárias presentes no território nacional denominada A2 (Mapa, 2008).

### **2.5.4 - Inimigos naturais de *Dactylopius opuntiae* no Brasil**

Em amostragens realizadas em diferentes regiões dos estados de Pernambuco e Paraíba foi constatada a presença de *Exochomus bimaculosos* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) *Coccidophilus citricola* Brèthes, *Chilocorus nigrita* (Fabricius), *Pentilia* sp., *Zagloba* sp., *Calloeneis* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) e o sirfídeo *Salpingogaster conopida* (Philipi) (Diptera: Syrphidae) (Santos et al., 2006), estes insetos no entanto são citados associados à cochonilha-de-escama, *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemiptera: Diaspididae)

que também ocorre em palma forrageira. Dentre os insetos anteriormente listados, *E. bimaculosus* e exemplares do gênero *Chrysoperla* foram encontrados predando espécies do gênero *Dactylopius* no estado de Pernambuco (Giolo, comunicação pessoal). Em inspeções realizadas em áreas de restinga dos estados de Santa Catarina e Espírito Santo *Cryptolaemus sp.* foi verificada predando *D. ceylonicus* (Silva et al., 2008).

Dentre os inimigos naturais encontrados no Brasil poucos são explorados em programas de controle biológico, pois pouco se sabe sobre aspectos relativos à sua biologia, ecologia, sistemática entre outros fatores essenciais envolvidos nos processos de produção, liberação e manejo destes inimigos naturais.

### **2.5.5 – Controle biológico clássico de *Dactilopius opuntiae***

Projetos em andamento têm adotado a abordagem de introdução de inimigos naturais oriundos das áreas com ocorrência da praga. Dentre estes inimigos naturais promissores para o controle de *D. opuntiae* há a joaninha predadora *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), que é oriunda da Austrália e foi importada do Chile em 1998 pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). Esta joaninha predadora vem sendo utilizada com relativo sucesso em vários programas de controle biológico de diversas espécies de cochonilhas em todo o mundo (Heidari & Copland, 1992; Mani & Krishnamoorthy, 2002).

O México é tido como centro de origem da cochonilha-do-carmim, sendo comum a ocorrência das espécies de coccinélídeos, predadores de *D. coccus*, *Hyperaspis trifurcata* Schaeffer e *Chilocorus cacti* (L.), consideradas pragas neste país, pois se trata de uma região onde se cultiva *D. coccus* para a extração do carmim (Portillo & Viguera, 1998). Os procedimentos legais para a importação das citadas espécies estão sendo realizados pela equipe do Laboratório de Quarentena de Insetos da Embrapa Meio Ambiente (Gava Embrapa, comunicação pessoal).

## 2.6. Uso de Fungos Entomopatogênicos contra *Dactylopius opuntiae*

Por se tratar de uma praga muito importante para a cultura da palma, faz-se necessário o desenvolvimento de medidas eficazes de controle. No entanto, o uso de agroquímicos não é uma prática exequível, uma vez que não há produtos registrados para o controle desta praga (Carvalho et al., 2005), além de ser oneroso e arriscado, podendo promover a ressurgência e ainda tornar a população de *D. opuntiae* resistente à aplicação dos produtos inicialmente considerados eficientes.

Dentre os agentes de controle biológico, os fungos entomopatogênicos podem representar uma alternativa no controle da cochonilha do carmim devido a algumas particularidades que os diferenciam dos demais patógenos, infectando uma vasta gama de hospedeiros nos mais diversificados ambientes (Hajek & St. Leger, 2004). Além de sua capacidade de atingir todos os estágios de desenvolvimento do hospedeiro penetrando por diversas vias predominantemente pelo tegumento sendo capaz de se dispersar horizontalmente (Alves & Lopes 2008). Outro aspecto relevante é a variabilidade genética desses entomopatógenos, o que pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos (Alves, 1998).

O gênero *Dactylopius* tem como característica típica a presença de uma camada protetora constituída por substâncias gordurosas e cerosas que possuem a capacidade de repelir soluções aquosas. Segundo Carvalho et al. (2005), esta característica bioquímica é uma das responsáveis pela ineficiência de produtos alternativos clássicos 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.

O tegumento, constituído pela cutícula, epiderme e membrana basal, é considerado a maior barreira à penetração dos fungos entomopatogênicos, conferindo aos insetos proteção mecânica, química e biológica. 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, posteriormente ocorre a germinação dando origem ao tubo germinativo e os apressórios, os quais possuem capacidade de penetrar a cutícula do inseto por meio de pressão mecânica e química, por meio de enzimas capazes de degradar os componentes da cutícula. Atingindo a hemolinfa o fungo se nutre e produz toxinas que afetam as células do hospedeiro levando-o à morte (Tiago & Furlaneto, 2003; Azevedo, 1998; Alves 1998).

Embora existam dificuldades, 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 reforçam esta tendência. O mercado latino-americano de inseticidas microbianos vem expandindo embora de modo ainda insipiente, considerando que a venda de produtos a base de fungos não supere US\$ 20 milhões por ano na América Latina. No Brasil, no entanto, 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 & Lopes, 2008).

### **2.6.1 - Interações fungo-hospedeiro**

Diversos eventos compõem o ciclo das relações fungo-hospedeiro tais como adesão, germinação, formação do apressório e grampo de penetração, penetração, colonização e reprodução. Durante estes eventos os fungos entomopatogênicos apresentam fatores de virulência, incluindo a produção de enzimas. Estudos relacionados à produção, destas enzimas em especial as proteases, quitinases e lipases têm sido realizados, e permitirão a elucidação dos fatores envolvidos na interação fungo-hospedeiro.

Considerando a complexidade da camada protetora do inseto em estudo, o conhecimento dos fatores envolvidos no processo de infecção pode ser decisivo na tomada de decisão frente à escolha do melhor fungo para efetivo controle da

referida praga. A princípio, serão considerados na relação patógeno-hospedeiro a produção de proteases e lipases pelos fungos testados associando seu aparato enzimático a fatores de patogenicidade e virulência.

## 2.6.2- Enzimas degradadoras da cutícula

A relação entre a virulência dos fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula vem sendo investigada. Muitos genes e enzimas têm sido caracterizados e estudados visando verificar sua participação no processo de infecção (St Leger et al., 1986a ; Bidochka & Kachatourians, 1988; Bogo et al., 1998; Moraes et al., 2003; Silva et al., 2004; Bittencourt et al., 2004).

A adesão propriamente dita é o resultado do reconhecimento da estrutura cuticular do hospedeiro pelo conídio. Este evento é dependente da topologia, bem como da composição química da cutícula do hospedeiro (Lord & Howard, 2004; Sosa-Gomez et al., 1997). A epicutícula dos insetos é recoberta por uma fina camada lipídica de natureza protéica (Arruda et al., 2005; Pedrini et al., 2007), que é importante no processo de reconhecimento do hospedeiro e provavelmente, define a especificidade fungo-hospedeiro. De acordo com resultados obtidos por Jarrold et al. (2007) por exemplo, os componentes da camada lipídica tanto de natureza apolar quanto polar podem promover a germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae*.

A superfície do conídio possui proteínas apolares denominadas hidrofobinas que são responsáveis pela interação com a camada lipídica presente na cutícula dos hospedeiros, permitindo assim a adesão (Fang et al 2007; St Leger et al, 1992). Resultados obtidos por Wang & St Leger (2006), demonstraram a participação de uma adesina codificada pelo gene *MAD1*, na adesão de conídios à cutícula de larvas de *Manduca sexta*. Mutantes nulos deste gene demonstraram germinação diminuída na cutícula do hospedeiro, além de reduzida virulência (Wang & St Leger 2006). Além de influenciar na adesão e germinação o gene da adesina *MAD1*, também controla a produção de

blastoporos, uma vez que mutantes nulos deste gene foram incapazes de formar estas células *in vitro* desenvolvendo-se como tubos germinativos (Wang & St Leger, 2007).

Após a germinação, a extremidade distal do tubo germinativo se diferencia em uma estrutura caracterizada pela dilatação da hifa denominada apressório. Diversos mecanismos estão envolvidos na formação do apressório em *M. anisopliae*, segundo St Leger et al. (1989b) a baixa concentração de nutrientes e a natureza hidrofóbica da superfície em que se desenvolve o tubo germinativo são fundamentais para a diferenciação da extremidade distal de hifa e formação do apressório.

Estudos recentes revelam a participação do gene *Mpl1*, o qual codifica uma perilipina, no desenvolvimento do apressório em *M. anisopliae*. As perilipinas são proteínas e circundam gotículas de lipídios no interior da célula como forma de armazenamento (Wang & St Leger 2007a).

As proteases de *M. anisopliae* têm sido intensamente estudadas. Durante o processo de infecção de *M. sexta*, pelo menos 14 isoformas de proteases com ponto isoelétrico (PI) variando entre 4,5 e 10 podem ser detectadas por zimogramas (St Leger, et al., 1998). Segundo Bagga et al., (2004), entre as proteases produzidas por *M. anisopliae*, as subtilisinas se encontram em maior número, sendo 11 os genes (Pr1 A - Pr1 B) que codificam para as diferentes isoformas destas enzimas. Linhagens de *M. anisopliae* com expressão aumentada de *pr1A*, apresentam maior patogenicidade ao hospedeiro *M. sexta* (St Leger et al., 1996c). Ao relacionar diretamente como fator de virulência linhagens *M. anisopliae* com expressão aumentada e constitutiva do gene *pr1A* mostraram-se mais infectivas quando comparadas a linhagens selvagens em larvas de *Anticarsia gemmatalis* não detectando, porém diferenças de infectividade quando o hospedeiro era o carrapato *Boophilus micropulus* (Franceschini, 2005). Estes resultados sugerem que *M. anisopliae* pode secretar diferentes subtilisinas de acordo com o hospedeiro infectado. Assim, as diferenças entre a capacidade de germinar e formar apressórios em hospedeiros suscetíveis ou não se devem basicamente à expressão diferencial dos genes



envolvidos na transdução de sinais do hospedeiro suscetível (Wang & St leger, 2005).

### **2.6.3. Papel das proteases no processo de infecção do hospedeiro**

Duas proteases alcalinas foram caracterizadas a partir do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ME1), sendo uma com atividade tipo quimoelastase com atividade tipo tripsina designadas Pr1 e Pr2, respectivamente. Através do emprego de inibidores enzimáticos, demonstrou-se que ambas possuem resíduos de serina e histidina no centro ativo. No entanto, Pr1 apresentou afinidade por aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) ou apolares (alanina e glicina), enquanto Pr2 hidrolisou caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina (St. Leger et al., 1987a). Proteases do tipo Pr1 e Pr2 também foram observadas em sobrenadante de cultivo de *Beauveria bassiana*, *V. lecanii*, *Nomuraea rileyi* e *Aschersonia aleyrodinis* (St. Leger et al., 1987b).

O papel de Pr1 na degradação de proteínas cuticulares foi descrito por St. Leger et al. (1988a). Estes autores demonstraram que a presença de inibidor de Pr1 ou anticorpos IgG (específico para Pr1) durante a infecção de *M. sexta* por *M. anisopliae* var. *anisopliae* reduziu a taxa de mortalidade do inseto. Observou-se também que não ocorreu penetração do fungo através da cutícula, embora tenha ocorrido germinação e formação de apressórios na sua superfície e que a presença de produtos de degradação da cutícula foi dependente da presença de Pr1. O papel de Pr1 na degradação localizada de proteínas cuticulares foi corroborado em outro estudo no qual esta enzima foi a principal protease produzida por estruturas infecciosas (apressório e tubos germinativos) durante a infecção (St. Leger et al., 1989).

O papel de Pr2 no parasitismo ainda não está completamente elucidado. Segundo St. Leger et al. (1987b), é possível que esta enzima atue no controle celular, catalisando processos de ativação e inativação proteolítica. De acordo com Paterson et al. (1994b), Pr2 estaria envolvida na ativação ou indução de Pr1

em *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Os resultados de Gillespie et al. (1998) reforçaram esta hipótese uma vez que, em cultivo Pr2 ocorre anteriormente a Pr1, de modo que ao investigarem a produção de Pr1 e Pr2 em 19 isolados de *M. anisopliae*, a atividade de Pr1 foi observada após 72 horas de incubação, enquanto a atividade Pr2 foi detectada, na maioria dos isolados, após 48 horas, sugerindo que Pr2 atuaria como precursora de Pr1 na cutícula liberando peptídios indutores de Pr1.

Proteases dos tipos Pr1, Pr2 e metaloproteases foram observadas também no sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* durante o crescimento em cutícula de *Blaberus giganteus* (St. Leger et al., 1994). Através de eletroforese de focalização isoeletrica, St. Leger et al. (1994) observaram a ocorrência de quatro isoformas de Pr1 e três isoformas de Pr2. Segundo estes autores, a presença destas isoformas variou conforme o meio de cultura e tempos de cultivo, sugerindo que elas podem ser diferentemente expressadas ou apresentar uma estabilidade que varia conforme o meio de cultivo.

#### **2.6.4. Atividade de Lipases**

A produção de lipases pode ser um fator de virulência para fungos entomopatogênicos, visto que há relatos da inibição da germinação de esporos de *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* por componentes das ceras produzidas por *Bemisia argentifolii*. Assim, embora observado o efeito sobre a germinação de conídio pela espessa camada de cera de ésteres de cadeia longa produzido pelas ninfas de mosca branca sobre *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*, seu papel na defesa a patógenos ainda não é clara (James et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Maliński et al. (2001), revelando o efeito inibitório de lipídios presentes em exoesqueletos dos pulgões *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* e *Brevicoryne brassicae* sobre *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*.

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* secretam lipases e esterases capazes de hidrolisar lipídios cuticulares de insetos (Bidochka

et al., 1997). A impossibilidade de utilizar lipídios presentes sobre a superfície da cutícula dos artrópodes pode reduzir a virulência de alguns fungos, estes lipídeos contribuem para a especificidade do patógeno-hospedeiro (St Leger, 1993; Kosir et al., 1991; Hegedus & Khachatourians, 1995).

As primeiras enzimas comprovadamente secretadas pelos fungos entomopatogênicos no início da penetração da cutícula de seus hospedeiros são as proteases. No entanto, é possível que as lipases precedam as proteases devido à camada de composição lipídica presente na epicutícula dos artrópodes (St Leger et al., 1986a; St Leger et al., 1991b; Clarkson & Charnley, 1996; Silva et al., 2005). Entretanto, pouco tem sido relatado em relação a estas enzimas comprovadamente secretadas por *M. anisopliae* (Silva et al., 2005).

O primeiro trabalho específico relatando a produção de lípases por *M. anisopliae* foi realizado por Silva et al., (2005). Antes deste trabalho, porém foram relatadas apenas detecções pontuais da atividade de lípase em FE (Robert & Aidroos, 1985; St Leger et al., 1986c; Nahar et al., 2004).

### **2.6.5. Interação fungo- hospedeiro- ambiente**

Ambientes tropicais e subtropicais são caracterizados pela incidência elevada de insolação e radiação solar resultando em altas temperaturas (Bayer, 2004).

Existem vários fatores ambientais como a radiação ultravioleta, chuva, pH, temperatura, umidade relativa, entre outros, que limitam a eficácia dos entomopatógenos em condições de campo. No entanto, tem-se buscado solucionar estes problemas e viabilizar a utilização destes organismos inserindo-os em programas de manejo integrado de pragas, por meio de diferentes formulações que vêm aumentando sua viabilidade.

A temperatura é um dos fatores de grande importância e atua sobre os patógenos afetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo. Esse fator, torna-se ainda mais importante, tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura

através de sistemas fisiológicos (Alves, 1982). A viabilidade e atividade biológica de fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pela temperatura, umidade, substrato, radiação ultravioleta e outros fatores (Abreu et al., 1983; Batista Filho & Cardelli, 1986; Alves et al., 1987). Segundo Hallsworth & Magan (1999), a faixa de temperatura entre 25-28<sup>o</sup>C e elevada umidade relativa são ótimas para o crescimento micelial de *M. anisopliae*.

A exposição dos conídios de *Metarhizium anisopliae* à radiação solar, pode diminuir a taxa de germinação, podendo ocasionar a perda de sua capacidade infectiva (Braga et al., 2006; Rangel et al., 2006). A exposição à radiação solar pode ser deletéria tanto pelo dano causado pela radiação UV-B, absorvida pelo DNA originando mutações, quanto pela radiação UV-A, responsável pela geração de estresse oxidativo o qual, por meio de espécies reativas de oxigênio causa dano indireto ao DNA (Braga et al., 2006).

A utilização de óleos tem aumentado a eficácia dos inseticidas microbianos, herbicidas e fungicidas. Óleos podem também ativar fungos patogênicos mantendo-os aptos em condições de baixa umidade e intensa radiação solar, criando oportunidades para a ampliação da aplicabilidade dos inseticidas microbianos. Formulações de inseticidas microbianos, em especial oleosas apresentam a vantagem de ser compatível com o método de aplicação em ultrabaixo volume (UBV).

Silva et al. (2006) verificaram a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier com agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal, quando empregados conjuntamente como adjuvantes em formulações de entomopatógenos. Dentre os 14 produtos testados: Assist, Attach, Agnique CSO 40-B, Agnique ESO 81-B Dytrol, Iharol, Joint Oil, Max Óleo, Natur Óleo, Nimbus e Veget Oil foram compatíveis com o isolado CG 432 de *B. bassiana*.

Os produtos Attach, Agnique CSO 40-B, Dash, Dytrol, Agnique ESO 81-B, Natur Óleo e Veget Oil foram compatíveis com o isolado UEL 50 de *M. anisopliae*. OPPA, Nimbus e Assist podem ser utilizados em conjunto com o isolado UNI 31

de *Paecilomyces* sp. Portanto, os óleos selecionados podem ser adicionados a caldas de pulverização contendo conídios dos fungos entomopatogênicos, sem riscos de efeitos deletérios (Silva et al., 2006).

Entre os entomopatógenos, os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, e *Paecilomyces* sp. Bainier têm sido amplamente utilizados no controle de insetos pragas, principalmente pela sua fácil produção em larga escala. Em geral, estes fungos são empregados na forma de conídios puros ou em conjunto com arroz que é o substrato utilizado para a produção massal (Alves & Pereira 1989). A aplicação, que é geralmente efetuada por pulverização tendo como principal diluente a água, é dificultada em função da natureza hidrofóbica da superfície conidial de inúmeros fungos entomopatogênicos (Boucias et al., 1988). Dessa forma, diferentes produtos devem ser adicionados à calda, não somente para permitir a suspensibilidade e dispersão em veículo apropriado, mas também para aumentar a deposição, espalhamento, molhamento, adesão, retenção e toxicidade sobre o alvo para qual é dirigido (Costa et al., 2003).

Os óleos emulsionáveis são boa alternativa de utilização como adjuvante na calda de pulverização, pois se misturam com água, permitindo a aplicação do inseticida microbiano com equipamentos convencionais já utilizados pelos produtores rurais (Alves et al. 2000), além da possibilidade em aumentar a infectividade do fungo (Alves et al. 1998a). Os óleos também têm a vantagem de promover excelente adesão na cutícula hidrofóbica do inseto (Prior & Jollands 1988).

Muitos são os produtos fitossanitários que possuem óleos nas suas formulações, tanto de origem vegetal como mineral, utilizados como inseticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas e espalhantes adesivos. Entretanto, alguns destes produtos podem influenciar os microrganismos, como no caso dos fungos entomopatogênicos, nos quais o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação, ou até mesmo a composição genética podem ser modificados, alterando a sua virulência (Alves et al. 1998b). Alguns trabalhos têm demonstrado a viabilidade de uso de fungos entomopatogênicos em conjunto com óleos, tanto

como adjuvantes em formulações (Nankinga et al., 2000; Alves et al. 2002; Consolo et al., 2003; Luz et al., 2004) quanto como sinergistas no controle de pragas (Batista Filho et al., 1994; Batista Filho et al., 1995; Leite et al., 1995; Hazzard et al., 2003).

A formulação do produto microbiano pode influenciar na atividade do fungo sobre o hospedeiro. Segundo Kaaya (2000), formulações a base de óleo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram mais eficazes no controle de larvas de *A. variegatum*, *R. apendiculatus* e *Boophilus decoloratus* do que formulações aquosas, em condições de laboratório e campo. Maranga et al. (2005) estudando o efeito de formulações de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na espécie *A. variegatum*, constataram que formulações em óleo são mais eficazes do que formulações aquosas dos mesmos fungos.

Alguns trabalhos revelam maior eficiência de formulações em óleos vegetais no controle de insetos, provavelmente pela característica lipofílica da formulação, que aumenta a adesão e penetração dos conídios no tegumento (Prior e Jollands 1988; Bateman et al., 1993).

Existem várias possibilidades de aplicação dos fungos entomopatogênicos como ferramenta no manejo integrado de pragas (MIP), não sendo recomendados como simples substitutos dos pesticidas químicos. Esses agentes microbianos, na forma de inseticidas microbianos, podem ser integrados a outras táticas de controle, a exemplo do controle biológico com parasitóides, práticas culturais, semioquímicos e controle químico (Alves et al., 1998b).

#### **2.6.6. MicoInseticidas no cenário brasileiro**

No Brasil, *M. anisopliae* é usado em grande escala para controlar um complexo de cigarrinhas, incluindo *Mahanarva fimbriolata* (Stål) e *M. posticata* em cultivos de cana-de-açúcar, e *M. fimbriolata*, *Deois flavopicta* (Stål) e *Notozulia entreriana* (Berg) em pastagens (Alves, 1998; Faria & Magalhães, 2001). Na realidade, várias pesquisas e programas de controle microbiano com fungos entomopatogênicos foram implementados no Brasil nas últimas quatro décadas.

Inseticidas microbianos à base de *M. anisopliae* representam 65% dos produtos, seguido por *B. bassiana* (20%), *Lecanicillium spp.* (7,5%) e “*S. insectorum*” (7,5%) (Tabela 2). Em termos de produção da mistura fungo+substrato nas biofábricas, por fermentação sólida em 2006/2007 foram produzidas 1.750 toneladas de *M. anisopliae*, 35 toneladas de *B. bassiana* e duas toneladas de *Lecanicillium spp.*, enquanto por fermentação líquida foram produzidos 3.000 litros de “*S. insectorum*” (Almeida & Batista Filho, 2007a).

Apesar da grande demanda de biopesticidas por parte dos agricultores e do retorno econômico potencial advindo do seu emprego em alguns agroecossistemas, a maioria dos micopesticidas não está registrada oficialmente no Brasil (Mapa, 2008; Anvisa, 2008) e via-de-regra, muitos deles ainda são vendidos tais como foram produzidos (substrato+fungo), sem nenhum tratamento posterior ou adição de substâncias que lhes assegurem melhorias na eficiência de controle, capacidade de armazenamento, persistência no agroecossistema ou praticidade de manuseio (Faria & Magalhães, 2001).

Embora sejam muito utilizados como produtos finais no Brasil, os concentrados técnicos (TK) apresentam algumas desvantagens que têm limitado a expansão do mercado de micopesticidas em razão da baixa satisfação dos usuários. Estes produtos são de difícil manuseio durante o preparo e a aplicação da calda, uma vez que são pouco práticos em alguns casos (ex. exigência de lavagem e peneração prévias) e em outros podem causar o entupimento de bicos dos pulverizadores devido à elevada proporção de inertes, principalmente quando são empregados baixos volumes de aplicação. Produtos que dificultam a aplicação levam a um maior custo de aplicação (Faria & Magalhães, 2001).

O desenvolvimento de formulações para biopesticidas não é tarefa fácil, pois geralmente se trabalha com microrganismos vivos, na intenção de manter sua viabilidade para, ao serem liberados cumprirem bem o seu papel controlando as pragas alvo. As melhores formulações para o armazenamento em câmara frigorífica foram as que apresentavam as seguintes proporções: 80% de conídios + 20 % de sílica gel e 80% de conídios+ 20% de talco. A formulação 50% de

conídios + 50% de sílica gel permanece viável (70% de viabilidade) em freezer por um período de 660 dias (Almeida et al., 2008).

Formulações a base de óleo vegetal e emulsificante, (suspensão concentrada), geraram resultados interessantes, tais como o uso de óleo de girassol e conídios de fungo, atingindo 240 dias de armazenamento com 90% de viabilidade à uma temperatura de 22<sup>o</sup>C (Marques, 1993). Visando atender o mercado brasileiro Alves e Batemam (2000), desenvolveram uma formulação a base de óleo Codacide com conídio de *M. anisopliae*, para armazenamento em temperatura ambiente por um período similar ao alcançado por Marques (1993).

Atualmente formulações a base de óleos emulsionáveis têm demonstrado melhor desempenho devido ao armazenamento em temperatura ambiente (25<sup>o</sup>C) por dois ou três meses, proteção dos conídios no campo após a aplicação, além da facilidade de aplicação aérea e terrestre. De acordo com Alves et al. (2000), o fungo *M. anisopliae* formulado em Ashlade<sup>®</sup> (óleo adjuvante emulsionável-OAE) alcançou níveis de germinação acima de 80% após 40 semanas, demonstrando que os OAE podem ser utilizados para a formulação deste patógeno.

## **2.7. Interações entre Formigas e Hemíptera: Sternorrhyncha**

As formigas interagem diretamente com outros organismos, com relações de herbivoria e predatismo, quanto como mutualistas (Meiado, et al., 2007). As formigas constituem um dos mais proeminentes grupos de organismos terrestres em termos de diversidade, abundância relativa e biomassa animal (Ward, 2006). A maioria das espécies de formigas é predadora e seu papel estruturador de comunidades de artrópodes tem sido destacado em vários estudos. Sua importância se deve principalmente ao comportamento eusocial aliado a complexos sistemas de comunicação, que permitem às formigas recrutar companheiras e defender recursos com grande eficiência (Hölldobler e Wilson, 1990, Kaminski et al, 2009).

A visitação freqüente de formigas às plantas em áreas tropicais se deve ao fato de que a vegetação dessas áreas é rica em fontes de alimentos renováveis.



Nestes ambientes, as formigas podem atuar como predadoras e acarretar um forte efeito sobre a comunidade de insetos herbívoros, estruturando redes tróficas e promovendo efeitos em cascata. A presença de formigas sobre plantas pode influenciar no ritmo dos insetos herbívoros basicamente de duas formas: (1) limitando sua ocorrência na folhagem através de interações antagônicas (ex. agressão, predação) ou (2) propiciando espaços livres de inimigos naturais para herbívoros mirmecófilos (que mantêm associações com formigas) (Kaminski et al., 2009). Os tipos de alimentos líquidos para formigas que são fornecidos por herbívoros mirmecófilos (que mantêm associações com formigas), são exsudatos de hemípteros (Buckley 1987, Del-Claro & Oliveira 1999, Stadler & Dixon 2005), e secreções de larvas de lepidópteros (Fiedler 1991, Pierce *et al.* 2002).

Conforme Beattie & Hughes (2002), nos ecossistemas tropicais as formigas são um componente de notável importância, constituindo mais de 15% da biomassa animal total.

Como predadoras generalistas, as formigas podem ser consideradas os principais fatores de pressão seletiva sobre insetos herbívoros. Conseqüentemente, elas podem afetar o padrão de utilização de plantas hospedeiras pelos herbívoros, incluindo o grau de especialização, bem como as estratégias de defesa contra predadores (Dyer 1995, Stamp 2001, Singer & Stireman 2003, Coley *et al.* 2006). Basicamente, existem duas conseqüências para insetos herbívoros inseridos em sistemas formiga-planta: a alta freqüência de formigas sobre a folhagem exerce um efeito negativo sobre os herbívoros (através de agressão e/ou predação) e limita a existência de espaços seguros, livre de inimigos naturais (Novotny *et al.* 1999, Floren *et al.* 2002, Oliveira *et al.* 2002); e as espécies de herbívoros mirmecófilos têm acesso a um espaço livre de inimigos na planta hospedeira por se beneficiarem da proteção oferecida pelas formigas associadas (Pierce *et al.*, 2002).

Muitas espécies de *Azteca* possuem uma estreita relação com hemípteros. Esta associação mutualística, conhecida como trofobiose, traz benefícios para as formigas, que garantem uma fonte de alimento e para os trofobiontes, que são assistidos pelas formigas através da retirada de substâncias excretadas por eles,

evitando a contaminação por fungos, além de protegê-los contra predadores (Delabie, 2001). Os casos mais comuns de trofobiose se encontram entre os indivíduos da superfamília Coccoidea (Sternorrhyncha), conhecidos como coccídeos. Este fato está relacionado com a inabilidade desses insetos em se locomover, ficando assim mais vulneráveis ao ataque de predadores (Delabie, 2001). Segundo Delabie & Fernández (2003), muitas espécies de formigas constroem refúgios de proteção para os coccídeos com restos vegetais, sobre as agregações, em locais favoráveis para a extração de seiva da planta. Estes refúgios são construídos em locais próximos de seus ninhos e tornam-se fontes de alimento permanentes para a colônia.

Algumas particularidades conferidas às formigas predadoras as credenciam como potenciais agentes de controle biológico natural de pragas dentre elas: populações relativamente estáveis; sistema de recrutamento é relativamente rápido; Responde eficientemente a variações na densidade de recurso; Forrageamento versátil, podendo atuar em diversos habitats ou estratos; abundância e biomassa elevadas; Repelência a algumas pragas (Way & Khoo, 1992), além de um potencial de restabelecimento, seja parcial ou total após sofrer distúrbios por meio de algumas espécies ou grupos ecológicos (Andersen & Majer, 2004).

O fato de formigas apresentarem caráter predatório generalista e protetoras de agregados de pulgões pode prejudicar o controle biológico, mostrando que seu papel pode não ser economicamente benéfico (Monteiro, 2008).

Segundo Ramalho et al., (1993), na região do semi-árido brasileiro, a dessecação dos botões florais do algodoeiro caídos no solo, parece facilitar a localização dos imaturos de *Anthonomus grandis* o bicudo-do-algodoeiro. Outro exemplo de predação por formigas é relatado por Fernandes et al., 1994, na região sudeste do Brasil, onde formigas *Pheidole spp.* são capazes de reduzir a população de bicudos-do-algodoeiro em diapausa ao interceptar os adultos tenerais, imediatamente após sua emergência dos botões.

Em se tratando de interações entre formigas e pulgões, as relações são tidas mais complexas, pois, além do néctar extrafloral e das infestações por herbívoros, o honeydew expelido pelos pulgões atrai formigas para a parte aérea da planta, iniciando o patrulhamento dos agregados dos hemípteros, sendo assim contribuem para um maior adensamento dos pulgões.

## 2.8. Justificativa e objetivos do trabalho

A cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*), tem alcançado níveis alarmantes nas áreas afetadas, dizimando extensas áreas de palma forrageira . Medidas mediatas de controle baseadas no uso de intensivo de agroquímicos, além de onerosas, oferecem riscos tais como contaminação ambiental e indução de resistência, selecionando populações menos sensíveis. Diante da carência de informações a respeito de métodos eficazes de controle para *D. opuntiae*, no Brasil e considerando as condições atuais das áreas atacadas constituídas principalmente agricultura familiar, a possibilidade do uso de fungos entomopatogênicos e/ou predadores naturais mostra-se como alternativas adequadas por seu caráter sustentável. Neste contexto, o uso de fungos entomopatogênicos e/ou predadores naturais para o controle biológico da cochonilha do carmim pode ser uma alternativa economicamente viável e ecologicamente aceitável, reduzindo a contaminação ambiental com agroquímicos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos:

- Determinar a patogenicidade e virulência de isolados de fungos entomopatogênicos a *Dactylopius opuntiae*;
- Caracterizar os melhores isolados de fungos entomopatogênicos, quanto ao tempo e à taxa de germinação dos conídios em condições extremas tais como exposição a radiação ultravioleta e temperaturas elevadas, revelando assim o potencial de persistência em nível de campo;
- Verificar, sob condições de campo, a eficiência de controle da cochonilha do carmim com o isolado de fungo selecionado;
- Verificar o potencial das formigas predadoras no controle de *D. opuntiae*.

### 3. TRABALHOS

#### PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA *Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)

##### Resumo

A cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* tem devastado os plantios de palma forrageira nos Estados do Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará e estima-se que os prejuízos tenham atingido aproximadamente R\$ 140 milhões. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial dos fungos entomopatogênicos para o controle de *Dactylopius opuntiae* em condições de laboratório e campo, bem como o efeito dos tratamentos sobre a população de formigas associadas a *D. opuntiae*. Foram testados isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces sp.*, *Lecanicillium lecanii* e dois isolados provenientes de epizootias naturais ocorridas no campo, *Fusarium sp.* e *Cladosporium sp.* A aplicação das suspensões em laboratório foi efetuada de forma direta, por meio de Torre de Potter, mediante a pulverização do inóculo ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conídios/ mL) combinado com óleo vegetal (8%) sobre fêmeas adultas e ninfas, estabelecidas em discos de palma forrageira (10 cm de diâmetro). Estes discos foram mantidos em temperatura ambiente e as

avaliações foram realizadas diariamente por um período de 15 dias. Para os ensaios em condições de campo, foi realizada aplicação dos formulados por meio de pulverizadores manuais e três dias após a aplicação as raquetes tratadas foram levadas para o laboratório, mantidas à temperatura ambiente onde foram realizadas avaliações diárias em um período de 10 dias. Os isolados provenientes de epizootias naturais não se mostraram patogênicos a nenhuma das fases de desenvolvimento de *D. opuntiae*. Dentre os 26 isolados de fungos avaliados, somente doze apresentaram conidiogênese sobre fêmeas adultas e quatorze isolados sobre ninfas. Os fungos foram aplicados em diferentes diluições sobre ambas as fases, o melhor desempenho dos isolados foi obtido na diluição  $1 \times 10^9$ , no entanto somente os isolados CG24 e LBC 55 diferiram significativamente entre as diluições sobre fêmeas adultas com valores de  $DL_{50}$   $9,03 \times 10^8$  e  $2,26 \times 10^7$ , respectivamente. Os melhores resultados de  $DL_{50}$  obtidos contra a fase de ninfa foram LPP19 ( $1,83 \times 10^3$ ), CG24 ( $6,21 \times 10^3$ ) e LCB55 ( $3,85 \times 10^6$ ). Ensaios de campo e laboratório foram realizados simultaneamente, verificando seu potencial patogênico em condições adversas.

## ABSTRACT

The scale insect *Dactylopius opuntiae* has devastated cactus palms in the States of Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará and is considered that the damage caused has reached approximately R\$ 140 million. The objective of this work was to investigate the potential of entomopathogenic fungi for the control of *Dactylopius opuntiae* under laboratory and field conditions, as well as the effect of fungal applications on populations of predator ants associated with *D. opuntiae*. Were tested isolates of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces sp.*, *Lecanicillium lecanii* and two isolates from naturally occurring epizootics, *Fusarium sp.* and *Cladosporium sp.* The application of the suspensions in laboratory was carried out directly using a Potter Tower, spraying  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidios / mL, combined with vegetable oil (8%) to adult females and nymphs, established on palm disks (10 cm in diameter). These disks were maintained at room temperature and evaluations were carried out daily for a period of 15 days. For the tests under field conditions, application was carried by manual spraying and three days after the application the treated cactus rackets were taken to the laboratory, maintained to room temperature where daily evaluations were carried out over a period of 10 days. The isolates from natural epizootics were not pathogenic to any of the phases of development of *D. opuntiae*. Among the isolates of evaluated (26 fungal isolates), only twelve isolates caused conidiogenesis on adult females and fourteen on nymphs. The fungi were applied in different dilutions against both stages, the most effective isolates were used at a dilution of  $1 \times 10^9$ , however only isolates CG24 and LBC 55 differed significantly among the dilutions against adult females with values of  $DL_{50}$ :  $9.03 \times 10^8$  and  $2.26 \times 10^7$ , respectively. The best results for  $DL_{50}$  obtained against the nymphal phase were for LPP19 ( $1.83 \times 10^3$ ), CG24 ( $6.21 \times 10^3$ ) and LCB55 ( $3.85 \times 10^6$ ). Field and laboratory tests were carried out simultaneously, verifying pathogenic potential under adverse conditions.

## INTRODUÇÃO

A pecuária está entre as principais atividades agrícolas desenvolvidas nas regiões semi-áridas. A região Nordeste do Brasil apresenta um rebanho bovino de 25.966.000 cabeças, 9.331.000 ovinos e 8.712.000 caprinos, representando 13,0 %, 58,0 %, e 93,0 % do rebanho brasileiro, respectivamente (IBGE, 2004).

A palma forrageira vem sendo adotada nas regiões semi-áridas do Brasil, como base da alimentação para os rebanhos bovinos, caprinos e ovinos, devido a suas características morfofisiológicas que a tornam apropriada para as condições edafoclimáticas típicas dessas regiões. Estima-se que a região do Nordeste brasileiro, possui uma área plantada com palma forrageira em torno de 550.000 ha, destacando-se Pernambuco e Alagoas, estados que possuem no momento, a maior área cultivada com esta cactácea (Teixeira et al., 1999; Araújo et al., 2005). A cultura da palma forrageira é também considerada uma atividade lucrativa, pois além da alimentação dos rebanhos, algumas famílias obtêm renda extra para o seu sustento cultivando palma para comercializar nas épocas de estiagem prolongada, período em que um hectare de palma chega a custar entre R\$ 100,00 e 200,00 ton<sup>-1</sup> (Lopes et al., 2001), atingindo em 2007 o valor de R\$ 500,00 ton<sup>-1</sup> (Gava, 2009, comunicação pessoal).

No entanto, este aliado dos pecuaristas nordestinos vem sendo seriamente ameaçado por uma praga denominada cochonilha do carmim (Lopes et al 2001; Santos et al., 2006), assim conhecida por produzir um importante corante largamente utilizado pela indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, têxtil entre outros setores (Rodriguez e Niemeyer 2000; Mendez-Gallegos et al., 2003; Portillo 2005).

A cochonilha do carmim pertence ao gênero *Dactylopius*, ordem Hemiptera família *Dactylopiidae*, este inseto é uma praga específica das espécies de cactáceas *Opuntia sp.* e *Nopalea*, sendo *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, seu hospedeiro preferencial. Estima-se que esta praga tenha atingido aproximadamente 13 % da área de palma plantada no semi-árido brasileiro,

acumulando um prejuízo de cerca de R\$ 140 milhões (Lopes et al., 2001; Bahe, 2007).

A espécie estabelecida na região nordeste do Brasil, *Dactylopius opuntiae*, já havia sido relatada nas regiões onde se cultivava a palma forrageira, tornando-se economicamente importante a partir de 1998, quando começou a causar danos significativos aos plantios de palma nos Estados do Pernambuco, Paraíba, atingindo a seguir o Ceará e Alagoas (Lopes et al., 2001; Datamétrica, 2006; Bahe, 2007).

Por se tratar de uma praga muito importante para a cultura da palma faz-se necessário o desenvolvimento de medidas eficazes de controle. No entanto, o uso de agroquímicos não é uma prática executável, uma vez que não há produtos registrados para o controle desta praga (Carvalho et al., 2005), além de ser oneroso e arriscado podendo promover a ressurgência e ainda tornar a população de *Dactylopius opuntiae* resistente à aplicação dos produtos inicialmente considerados eficientes.

Diversos autores têm demonstrado a importância da seleção de isolados de fungos entomopatogênicos no controle de pragas, revelando que a variabilidade genética desses microrganismos constitui-se no grande potencial para o controle de pragas, além de não haver uma ligação direta do isolado com o hospedeiro e local com a virulência do mesmo (Batista Filho *et al.* 2002).

De acordo com Almeida & Batista Filho (2001), a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de uma praga é uma das etapas mais importantes para a determinação da virulência, aspectos reprodutivos e produção em meio de cultura artificial, para a posterior utilização como bioinseticida.

Desta forma enfatizando o controle biológico, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial dos fungos entomopatogênicos no controle da cochonilha do carmim associados com óleo vegetal para melhorar a fixação dos esporos sobre as colônias de cochonilhas do carmim, visto que as mesmas, por serem cobertas por substâncias gordurosas e cerosas possuem a capacidade de repelir soluções aquosas. Segundo Carvalho et al. (2005), esta característica é uma das



responsáveis pela ineficiência de produtos alternativos clássicos 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.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico situado na fazenda experimental do IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, em Sertânia-PE.

Foram testados 24 isolados de fungos entomopatogênicos provenientes das coleções do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e do Laboratório de Controle Biológico (LCB), da Embrapa Semi-árido, sendo 15 isolados de *Beauveria bassiana* (LPP19, LPP110, LPP114, CG 24, LCB58, LCB52, LCB54, LCB 55, LCB62, LCB63, LCB65, LCB66, LCB73, LCB74, LCB77), um isolado de *Paecilomyces sp.* (LCB 81), um isolado de *Lecanicillium lecanii* (LPP 04) e seis isolados de *Metarhizium anisopliae* (CG51, LCB53, LCB56, ESALQ 818, LCB60, LCB61).

### **Bioensaio 1- Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos a *Dactylopius opuntiae* em condições de laboratório e campo**

Os isolados de fungos foram cultivados em arroz parbolizado autoclavado em Erlemeyer, e incubados em câmara BOD, a  $27 \pm 1^\circ$  C, durante 15 dias, para crescimento e conidiogênese. Os conídios foram extraídos com Triton X 0,05% e uma suspensão fúngica preparada, a qual foi quantificada a partir de uma câmara de Neubauer, em microscópio óptico procedendo-se uma diluição seriada para obtenção da concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ mL. Esta concentração de conídios foi aplicada sobre os insetos nas fases de ninfa e adultos nas formulações: fungo + Triton e fungo + óleo vegetal 8%.

A aplicação das suspensões de fungos entomopatogênicos sobre os insetos testados em laboratório foi efetuada de forma direta, por meio de Torre de Potter, mediante a pulverização de 1 mL do inóculo sobre os insetos na fase de ninfa e adultos instalada sobre discos de palma forrageira (10 cm de diâmetro). Os insetos dos tratamentos controle foram pulverizados apenas com água destilada estéril + Triton a 0,05% (1mL) e água destilada estéril + Triton a 0,05% + óleo vegetal 0,8% (1mL)

Os insetos adultos utilizados nos testes de patogenicidade eram provenientes de áreas naturalmente infestadas. As ninfas foram colocadas nos discos de palma com o auxílio de um pincel, sendo um total de trinta ninfas por disco e três discos por isolado. Posteriormente estes discos de palma foram mantidos em ambiente escuro por 24 horas antes da aplicação, de modo a evitar fuga das ninfas e facilitar sua fixação. Para os testes com fêmeas adultas, foram cortados discos de palma nas mesmas dimensões dos utilizados para os testes de ninfas, obedecendo ao critério de conter no mínimo 10 fêmeas estabelecidas por disco, sendo três discos por tratamento.

Após a pulverização das formulações a base de fungos entomopatogênicos e óleo vegetal, os discos de palma foram mantidos em uma sala com temperatura ambiente oscilando de 20 a 24<sup>o</sup> C. As avaliações foram realizadas diariamente, por um período de 15 dias, sendo a causa da mortalidade determinada pelo crescimento e esporulação do fungo sobre os cadáveres. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 25 tratamentos e 3 repetições/tratamento.

Por se tratar de um inseto com duas fases distintas, uma fase móvel e uma fase em que permanecem fixas, as avaliações das mesmas foram realizadas seguindo critérios diferenciados. As fêmeas adultas utilizadas nos ensaios de patogenicidade apresentavam uma densa camada de cera, o que dificultava a determinação da mortalidade das mesmas. Sendo assim, foi verificada a sensibilidade ao toque por meio de estilete de ponta fina, aquelas que

apresentassem tal sensibilidade por meio de movimento de contração e demonstrassem corpo túrgido eram consideradas vivas e ativas, enquanto as que não se moviam e apresentavam corpo flácido ou que apresentassem conidiogênese eram consideradas mortas.

A verificação da mortalidade das ninfas foi feita por meio de modificação na coloração das mesmas. As ninfas que apresentavam coloração vermelho intenso, se moviam normalmente e se fixavam eram consideradas vivas, enquanto as ninfas que apresentavam coloração vermelho pálido, não se fixavam nem se moviam eram consideradas mortas. Após a constatação da morte destes insetos os mesmos eram banhados em álcool 70% e mantidos em câmara úmida para verificação da conidiogênese.

Experimento semelhante foi realizado em condições de campo simultaneamente em áreas naturalmente infestadas onde foram selecionadas raquetes contendo pelo menos 10 colônias estabelecidas e ativas. As pulverizações das suspensões fúngicas foram realizadas com pulverizadores manuais. Foram realizadas pulverizações de formulações OW dos isolados, tendo como controle a pulverização com água destilada e formulação OW sem conídios foi realizada em 3 áreas no município de Sertânia. As avaliações foram realizadas durante 3 dias nos períodos diurno e noturno, a partir de 12 horas após a pulverização. Após o final das observações de campo, uma raquete por planta tratada foi removida e levada para laboratório para a avaliação da taxa de infecção causada pelos isolados.

### **Bioensaio 2- Avaliação da virulência de isolados a *Dactylopius opuntiae* em condições de laboratório**

Neste bioensaio foram utilizados os fungos considerados patogênicos a *Dactylopius opuntiae* através dos resultados de bioensaio 1. Os critérios utilizados na seleção dos isolados mais promissores foram:

1. Isolados que demonstravam patogenicidade confirmada sobre ninfas e adultas simultaneamente (exceto LPP19);
2. Isolados com taxa de conidiogênese elevada em curto período de tempo no substrato utilizado (arroz parbolizado);
3. Isolados que demonstraram patogenicidade confirmada a cochonilhas adultas em condições de campo.

As avaliações de virulência do isolado selecionadas foram realizadas em condições de laboratório em diferentes concentrações ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ), de forma a verificar a concentração adequada para fins de controle. Os resultados foram submetidos à análise de regressão para determinação das doses letais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Bioensaio 1 – Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a *Dactylopius opuntiae* em condições de laboratório e campo.**

Os resultados do Quadro 1 mostram que alguns fungos foram patogênicos a fêmeas adultas de *D. opuntiae* somente em condições de laboratório. Este fato pode estar ligado provavelmente à competição entre os fungos testados e os fungos saprófitas presentes sobre os cadáveres. Segundo Shearer (1994), essa competição é demonstrada freqüentemente em laboratório em materiais oriundos de diferentes nichos.

Quando avaliados em condições de campo os isolados de *M. anisopliae* apresentaram porcentagens de mortalidade superiores aos isolados de *B. bassiana* (dados não mostrados). Vários estudos já foram realizados testando isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em condições de campo contra hemipteros tais como Luz et al. (2004) em *Triatoma infestans* e Tanzini (2002) em *Leptopharsa herveae*, Gomes & Morcardi (1998). Estes últimos autores, assim

como Luz et al. (1998) e Azevedo et al. (2005) verificaram que isolados de *M.anisopliae* são superiores a *B. bassiana*, causando uma maior mortalidade em um curto período de tempo.

Dentre os fungos testados foram considerados patogênicos somente os que apresentavam conidiogênese sobre cadáveres. Apenas dez destes fungos testados foram patogênicos a adultos e ninfas respectivamente (LCB52, LCB 53, LCB 55, LCB56, LCB62, LCB63, LPP110, LPP114, ESALQ 818 e CG24). Dentre os isolados testados apenas dois apresentaram conidiogênese em cadáveres de cochonilhas adultas. O isolado LCB61 somente apresentou conidiogênese sobre cadáveres de insetos adultos em condições de laboratório, já o isolado LCB81, apresentou conidiogênese tanto em condições de campo quanto em laboratório. Os isolados LCB66, LCB75, LPP04 e LPP19, apresentaram conidiogênese apenas na fase de ninfa, demonstrando diferença de suscetibilidade entre as duas fases de desenvolvimento da praga em estudo. Esta diferença de patogenicidade entre as fases também foi observada por Soza-Gómez & Moscardi e Todorova et al. (2002). Ao verificar os efeitos de isolados de fungos entomopatogênicos sobre pentatomídeos, seus resultados também revelam uma diferença em susceptibilidade entre ninfas e adultos. Estas variações são comuns, visto que possivelmente ocorram diferenças genéticas e fisiológicas entre os isolados ou ainda fatores relacionados à produção de toxinas pelos fungos e características do inseto estudado (Butt et al., 1992; Khachatourians, 1992). Quanto à ausência de confirmação de mortalidade de fêmeas adultas de *D. opuntiae*, pode estar relacionada à inibição da germinação dos conídios por possíveis componentes cuticulares. Alguns trabalhos desenvolvidos com Hemípteros têm demonstrado diferença entre suscetibilidade entre instares, Sosa-Gómez & Moscardi (1997), em ensaios com *Nezara viridula*. (James et al., 2003), em ensaios com *B. argentifolli* atribuem a inibição de germinação de conídios de fungos entomopatogênicos à camada de cera produzida na cutícula de mosca-branca, sugerindo que estas ceras podem agir como uma primeira linha de defesa contra entomopatógenos.

A fase de ninfa demonstrou suscetibilidade a um maior número dos isolados testados, pois dentre os 24 isolados testados 14 apresentaram conidiogênese sobre os cadáveres (Quadro 1). Este fato pode estar relacionado à pulverização direta sobre as ninfas, sabendo-se que nesta fase de seu desenvolvimento, não possuem a camada de cera característica da família, sendo assim os fungos testados tiveram acesso facilitado ao tegumento das ninfas.

Os resultados de campo foram obtidos a partir de raquetes de palma contendo fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae* provenientes de áreas naturalmente infestadas, sendo assim tinha fêmeas de diferentes idades. Esta condição experimental pode ter inibido a conidiogênese dos fungos testados, pois a infestação era bastante elevada, e no campo estava suscetível à ação de outros fungos oportunistas inibindo o desenvolvimento dos isolados testados.

Quadro 1. Patogenicidade confirmada de isolados de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas adultas e ninfas migrantes de *Dactylopius opuntiae* em condições de campo e laboratório.

Código de identificação	Espécies	Conidiogênese		
		Campo	Laboratório	
Isolados		Fêmeas adultas	Ninfas	Fêmeas adultas
LCB 52	<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+
LCB 53	<i>Metarhizium anizopliae</i>	+	+	+
LCB 54	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-
LCB 55	<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+
LCB 56	<i>Metarhizium anizopliae</i>	+	+	-
LCB 58	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-
LCB 60	<i>Metarhizium anizopliae</i>	-	-	-
LCB 61	<i>Metarhizium anizopliae</i>	-	-	+
LCB 62	<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+
LCB 63	<i>Beauveria bassiana</i>	-	+	+
LCB 65	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-
LCB 66	<i>Beauveria bassiana</i>	-	+	-
LCB 73	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-
LCB 74	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-
LCB 75	<i>Beauveria bassiana</i>	-	+	-
LCB 77	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-

LCB 81	<i>Paecilomyces sp</i>	+	-	+
LPP04	<i>Lecanicilium lecanii</i>	-	+	-
LPP19	<i>Beauveria bassiana</i>	-	+	-
LPP110	<i>Beauveria bassiana</i>	-	+	+
LPP114	<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+
ESALQ 818	<i>Metarhizium anisopliae</i>	+	+	-
CG 51	<i>Metarhizium anisopliae</i>	-	-	-
CG 24	<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+
LCB23	<i>Fusarium sp</i>	-	-	-
LCB21	<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-

\*LCB - Micoteca do Laboratório de Controle Biológico/ EMBRAPA

\*\*LPP - Micoteca do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia/ UENF

\*\*\*ESALQ – Micoteca da ESALQ/USP

\*\*\*\*CG - Micoteca CENARGEN

A radiação ultravioleta representa um dos fatores ambientais que mais compromete a viabilidade e a persistência de microorganismos (Batista filho *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2006; Rangel *et al.*, 2006). Entretanto, alguns dos isolados testados foram efetivos mesmo nas condições de alta intensidade de raios nocivos a que foram expostos. É possível inferir que a presença do óleo vegetal possa ter conferido a proteção necessária ao inóculo durante o processo de adesão, germinação e penetração dos fungos no tegumento do inseto. É sabido que a formulação do produto microbiano pode influenciar na atividade do fungo sobre o hospedeiro. Segundo Kaaya (2000), formulações a base de óleo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram mais eficazes no controle de larvas de *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Boophilus decoloratus* do que formulações aquosas, em condições de laboratório e campo. Maranga *et al.* (2005) estudando o efeito de formulações de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na espécie *A. variegatum*, constataram que formulações em óleo são mais eficazes do que formulações aquosas dos mesmos fungos.

### **Bioensaio 2- Avaliação da virulência de isolados a *Dactylopius opuntiae* em condições de laboratório**

Um aspecto importante na avaliação do desempenho dos isolados de fungos entomopatogênicos está relacionado à dose necessária do inóculo para

controlar 50% da população testada ( $DL_{50}$ ). O resultado das Tabelas 1 e 2, mostram o desempenho dos isolados de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas adultas e ninfas de *Dactylopius opuntiae* por meio da sua  $DL_{50}$ . Conforme representado nas Tabelas 1 e 2, há um certo grau de especificidade entre os isolados e a fase de desenvolvimento da praga, sendo assim alguns isolados se mostram mais efetivos quando aplicados sobre ninfas e outros se mostram mais efetivos sobre fêmeas adultas.

Os isolados CG 24 e LCB55 foram patogênicos a ambas as fases de desenvolvimento da praga, porém as Tabelas 2 e 3 mostram desempenho diferenciado para tais fungos nas diferentes fases. Os dois isolados foram mais efetivos contra ninfas. De acordo com a análise de regressão, o isolado LCB55 mostra-se mais promissor visto que sua  $DL_{50}$  foi  $2,26 \times 10^7$ .

Tabela 1. Virulência de isolados de fungos entomopatogênicos a fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae*

Isolados	Dose Letal		Intervalo de confiança		$X^2$	P
CG24	$DL_{50}$	$9,03 \times 10^8$	$1,12 \times 10^8$	$8,4 \times 10^{12}$	2,715	0,438
	$DL_{95}$	$1,42 \times 10^{13}$	$5,70 \times 10^{10}$	$7,05 \times 10^{19}$		
LCB55	$DL_{50}$	$2,26 \times 10^7$	$9,55 \times 10^5$	$1,08 \times 10^9$	0,89	0,828
	$DL_{95}$	$7,73 \times 10^{11}$	$5,66 \times 10^9$	$1,20 \times 10^{16}$		

A Tabela 1 mostra os valores de  $DL_{50}$  dos isolados CG24 e LCB 55 sobre fêmeas adultas de *D. opuntiae* em condições de laboratório. O isolado LCB55, mostrou-se mais promissor com uma  $DL_{50}$  de  $2,26 \times 10^7$  conídios/mL, enquanto que o isolado CG24 apresentou uma  $DL_{50}$  de  $9,03 \times 10^8$  conídios/mL. Esta diferença de desempenho pode estar ligada ao nível de especificidade dos isolados para o inseto testado.

Quando analisados os resultados obtidos para os mesmos isolados sobre ninfas (Tabela 2), pode ser verificada uma diminuição na  $DL_{50}$ , este fato pode estar relacionado com a presença da camada protetora de cera que as fêmeas adultas de *D. opuntiae* apresentam. Segundo Szafranek et al., (2002), alguns componentes das ceras de Sternorrincha podem inibir o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos.



Tabela 2. Virulência de isolados de fungos entomopatogênicos em ninfas de *Dactylopius opuntiae*.

Isolados		Dose Letal	Intervalo de confiança		X <sup>2</sup>	P
LPP19	DL <sub>50</sub>	1,83 x 10 <sup>3</sup>	1,57 x 10 <sup>2</sup>	8,56 x 10 <sup>4</sup>	4,467	0,215
	DL <sub>95</sub>	1,35 x 10 <sup>9</sup>	4,61 x 10 <sup>7</sup>	4,95 x 10 <sup>11</sup>		
CG24	DL <sub>50</sub>	6,21 x 10 <sup>3</sup>	1,25 x 10 <sup>2</sup>	1,86 x 10 <sup>5</sup>	1,67	0,643
	DL <sub>95</sub>	1,51 x 10 <sup>10</sup>	3,22 x 10 <sup>9</sup>	1,62 x 10 <sup>21</sup>		
LCB52	DL <sub>50</sub>	4,73 x 10 <sup>6</sup>	4,29 x 10 <sup>4</sup>	9,38 x 10 <sup>7</sup>	4,48	0,217
	DL <sub>95</sub>	3,49 x 10 <sup>12</sup>	1,02 x 10 <sup>10</sup>	1,22 x 10 <sup>23</sup>		
LCB55	DL <sub>50</sub>	3,85 x 10 <sup>6</sup>	5,47 x 10 <sup>5</sup>	1,98 x 10 <sup>7</sup>	4,58	0,207
	DL <sub>95</sub>	1,08 x 10 <sup>11</sup>	3,45 x 10 <sup>9</sup>	1,55 x 10 <sup>15</sup>		
LCB56	DL <sub>50</sub>	3,64 x 10 <sup>7</sup>	3,47 x 10 <sup>5</sup>	1,97 x 10 <sup>8</sup>	0,915	0,822
	DL <sub>95</sub>	4,13 x 10 <sup>13</sup>	3,45 x 10 <sup>9</sup>	1,55 x 10 <sup>15</sup>		
LCB62	DL <sub>50</sub>	8,41 x 10 <sup>5</sup>	1,61 x 10 <sup>5</sup>	2,57 x 10 <sup>6</sup>	0,328	0,955
	DL <sub>95</sub>	2,19 x 10 <sup>8</sup>	4,94 x 10 <sup>7</sup>	4,10 x 10 <sup>10</sup>		
LPP110	DL <sub>50</sub>	2,73 x 10 <sup>6</sup>	9,57 x 10 <sup>5</sup>	6,82 x 10 <sup>8</sup>	2,557	0,47
	DL <sub>95</sub>	7,69 x 10 <sup>9</sup>	1,73 x 10 <sup>8</sup>	1,18 x 10 <sup>11</sup>		

Em resultados mostrados anteriormente, verificou-se que o isolado LPP19 somente foi efetivo contra ninfas, resultado reforçado na Tabela 3 onde este mesmo fungo demonstrou o melhor desempenho, perante grupo de isolados testados para esta fase de desenvolvimento da praga com uma DL<sub>50</sub> de 1,83 x 10<sup>3</sup> conídios/mL.

A fase de ninfa apresentou valores estimados de DL<sub>50</sub> para os isolados LCB55 (3,85 x 10<sup>6</sup> conídios/mL) e CG24 (6,21 x 10<sup>3</sup> conídios/mL) bem inferiores aos obtidos sobre insetos adultos. Este fator pode estar ligado à ausência da camada cerosa nesta fase de desenvolvimento, facilitando o contato das unidades infectivas dos isolados testados ao tegumento do inseto. Conforme Oliveira et al. (2004), a capacidade do fungo em causar mortalidade se deve à habilidade de seus conídios em reconhecer e produzir enzimas para degradar a cutícula do hospedeiro e como a fase de ninfa não apresenta ainda a camada de ceras desenvolvida os fungos conseguem degradar a cutícula com maior eficiência.

Os resultados nas Figuras 1 e 2 demonstraram uma ligeira relação entre a quantidade de conídios aplicada e a mortalidade de *D. opuntiae*. Esse fato

também foi constatado por outros autores estudando isolados de fungos entomopatogênicos em diferentes espécies de insetos (Alves et al., 1985; Silva et al., 2003). Segundo Fernandes & Alves (1992), uma provável explicação para este fato se deve à relação diretamente proporcional entre o número de conídios e a mortalidade, ou seja quanto mais conídios penetram, mais toxinas ou enzimas são liberadas, aumentando a mortalidade do inseto. No entanto, a velocidade de ação do fungo depende, além da dosagem, das espécies hospedeiras envolvidas (Sosa-Gómez & Moscardi, 1992). Segundo St. Leger (1991), a variação de virulência de isolados de fungos entomopatogênicos está relacionada com a composição química da cutícula e os processos bioquímicos envolvidos para a formação do tubo germinativo e colonização do hospedeiro.

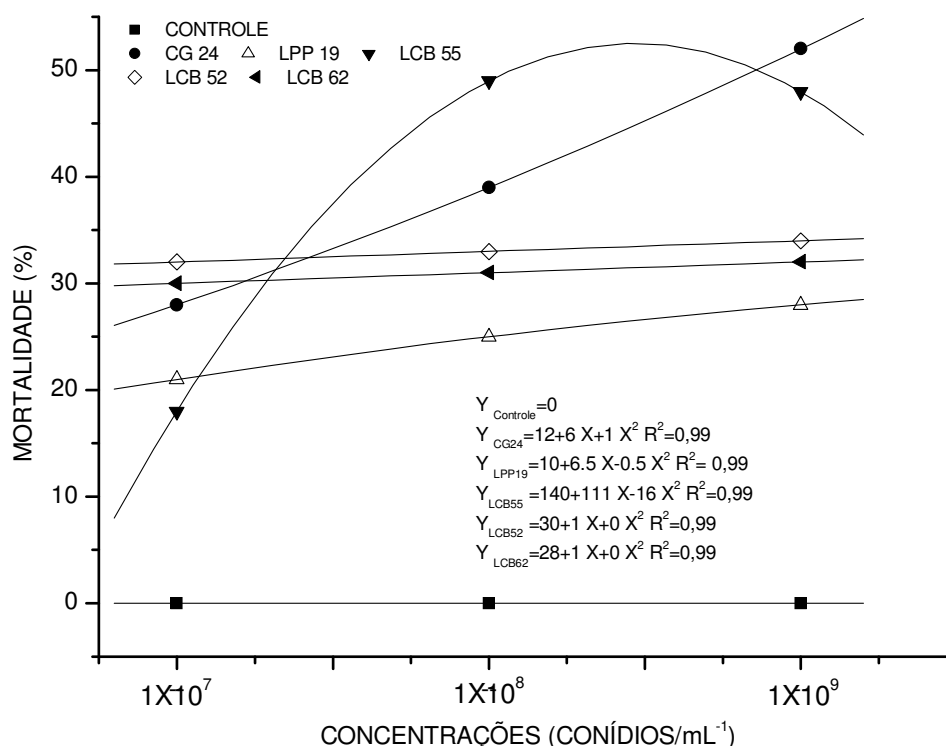


Figura 1. Mortalidade de Fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae* submetidas à pulverização de fungos entomopatogênicos em condições de laboratório usando três concentrações de conídios

O melhor desempenho dos isolados foi obtido na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL, no entanto somente os isolados CG24 e LCB 55 diferiram significativamente entre as concentrações (Figura 1) sobre fêmeas adultas. Os isolados CG24 e LCB 55 promoveram mortalidade confirmada acima de 80% sobre as ninfas, diferindo do isolado LCB 52 (60%). Resultados parecidos foram obtidos por Andaló et al (2004) ao utilizar fungos no controle de cochonilhas, demonstrando resultados promissores entre 58% e 62% de mortalidade quando aplicados em fêmeas adultas de *Dysmicoccus texensis*.

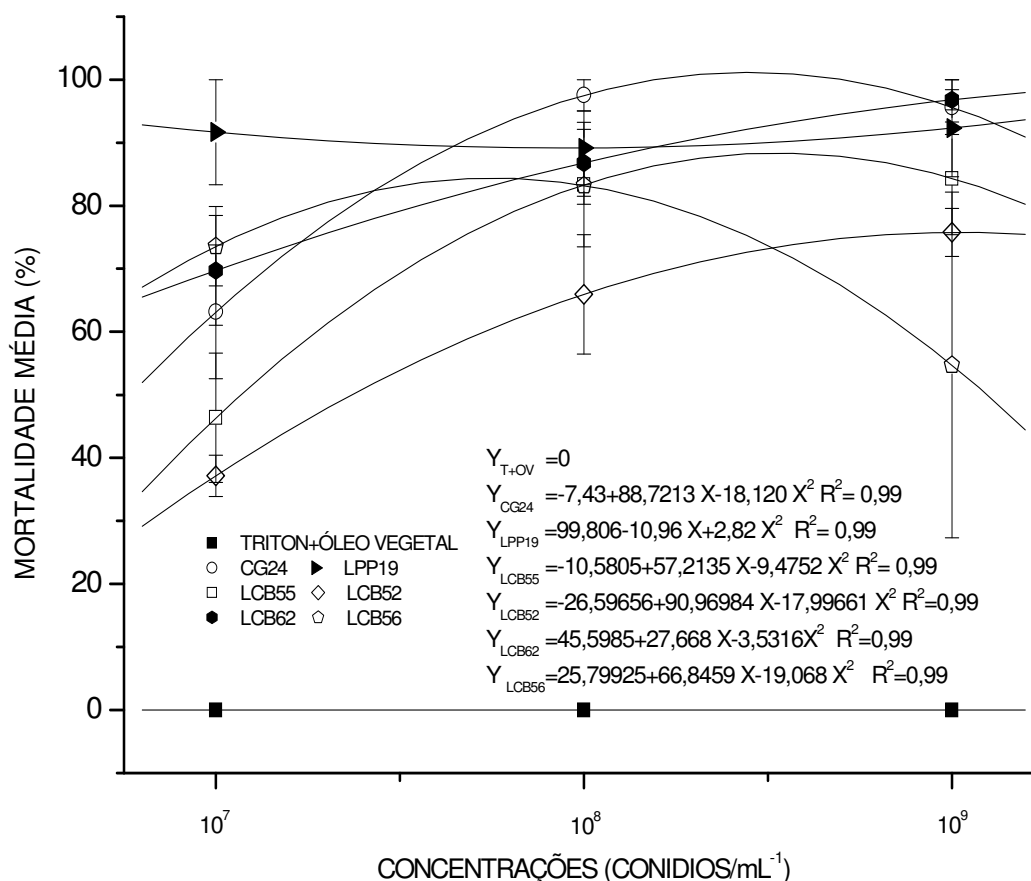


Figura 2. Mortalidade de ninfas migrantes de *Dactylopius opuntiae* submetidas à pulverização de fungos entomopatogênicos em condições de laboratório usando três concentrações de conídios.

## CONCLUSÕES

1. Os resultados revelam que a maioria dos fungos estudados apresentou patogenicidade a *D. opuntiae*;
2. Nas condições avaliadas a adição de óleo ao fungo parece favorecer não só sua adesão à camada de cera das fêmeas adultas, como também atua na proteção às unidades infectivas dos fungos em condições de campo;
3. Com base nos resultados obtidos serão realizados novos ensaios com os isolados mais promissores, verificando seu desempenho em relação às condições adversas tais como radiação ultravioleta e temperaturas elevadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J. E. M. & A. Batista Filho (2001). Banco de microrganismos entomopatogênicos. Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenvolvimento. 20: 30-33.
- Alves, S.B. (1986c ). Patologia geral. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole, p.3-70.
- Alves, B.S. & Lopes, R. B. (2008). Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ. V. 14.p.69-104.
- Alves, S.B. (1982). Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorok. 95p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Alves, S.B. (1986a). Epizootiologia. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole,. p.29-60.
- Alves, S.B. (1986b). Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole,. p.73-126.
- Alves, S.B.; Silveira Neto, S.; Pereira, R.M.; Macedo, N. (1987). Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. Ecossistema, Espírito Santo do Pinhal, v.12, p.78-87.
- Ameida, A. M.; Figueiredo, R. A. 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a brazilian rainforest: effects on herbivory and polinization. Brazilian Journal of Biology, São Carlos-SP, v. 63, n. 4, p. 551-558.
- Arruda, W.; Lübeck, I.; Scrank, A.; Vainstein, M.H. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Experimental and Acarology. 37:231-244.
- Askary H., Yarmand H., (2007). Development of the entomopathogenic hyphomycete *Lecanicillium muscarium* (Hyphomycetes: Moniliales) on various hosts.- European Journal of Entomology, 104: 67-72.A1:A82
- Askary, H., Benhamou, N., & Brodeur, J. (1999). Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology, 74, 1-13.
- Bateman R P. 1997. Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 67-79.

- Batista Filho, A., J.E.M. Almeida & L.A. Machado. (2002). Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 8., 2002, Recife. Anais. 21: 84-89.
- Batista Filho, A.; Cardelli, M.A. (1986). Viabilidade dos esporos de *B. bassiana* (Bals.)Vuill. isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. *Biológico*, São Paulo, v. 52, p.57- 59.
- Berto, P.; Comménil, P.; Belingheri, L.; Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *Fems Microbiology. Lett* 180:183-189.
- Bidochka, M. J.; St. Leger, R. J.; Roberts, D. W. (1997). Mechanisms of Deuteromycete fungal infection in grasshoppers and Locusts an overview. *Memoris of the Entomological Society of Canada*. 171:213-224.
- Bittencourt, S. E. T.; Castro, L. A.; Farias, S. E.; Bao, S. N.; Scrank, A. & Vainstein, M. H. (2004). Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricid fungus *Metarhizium anisopliae*. *Res. Microbiol.* 155:681-687.
- Bogo, M. R.; Rota, C.A.; Pinto JR. H.; Campos, M.; Corrêa, C. T.; Vainstein, M. H. & Scrank, A. (1998). A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Curr. Micrbiol.* 37:221-225.
- Braga G.U.; Rangel, D. E.; Anderson, A. J.; Roberts, D.W. (2006) Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*. V.82, p. 481-422.
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Messias, C.L.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001a). Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v. 72, p.140-146.
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001b). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61oN to 54oS. *Journal of Invertebrate Pathology*, Duluth, v.78, p.98-108,
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001c). Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v.74, p.734-739.
- Brandão, C.R.F. Formigas dos cerrados e caatingas. 1995. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 147f.1995.

- Clarkson, J.M. & Charnley, A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* 4:197-204.
- Cuezo, F. 2003. Subfamilia Dolichoderinae. In: Fernández, F. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 291-297.
- Del Val, E.; Dizo, R. 2004. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. *Interciencia*, Caracas, v. 29, n. 12, p. 673-679, dec. Floren, A.; A. Biun & Linsenmair. 2002. Arboreal ants as key predators in tropical lowland forest trees. *Oecologia* 131: 137-144
- Delabie, J. H. C. & Fernández, F. 2003. Relaciones entre hormigas y "homópteros" (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: Fernández, F. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 181-197.
- Delabie, J.H.C.; Agosti, D. & Nascimento, I.C. 2000. Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain forest region. In: Agosti, D.; Majer, J.D.; Alonso, L. & Schultz, T. (Eds.), *Sampling ground-dwelling ants: case studies from the world's rain forests*. Bulletin 18. Curtin University School of Environmental Biology, Perth, Australia, p.117.
- extracelular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.52, p.285-293.
- Fang, W.; Pei, Y.; Bidochka, M. J. (2007). A regulation of a G protein Signaling (RGS) gene *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. 153:1017-1025.
- Faria, M.R.; Magalhães, B.P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.22, p.18-21.
- Fernández, F.; Palacio, E. E. 2003. Sistemática y filogenia de las hormigas: breve repaso a propuestas. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 29-44.
- Fowler, H. G.; L. C. Forti; C. R. F. Brandão; J. H. C. Delabie & H. L. Vasconcelos. 1991. Ecología nutricional de formigas. p: 131-223. In: A. R. Panizzi, & J. R. P. Parra. *Ecología nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo, Editora Manole Ltda. 359 p.
- Gillespie JP, Bateman R and Charnley AK (1998) Role of cuticle- degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 71:128-137.
- Hajek, A. E. and St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-32.
- Hallsworth, J.E. & Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.* 74: 261-266.

- Hegedus, D. D., y Khachatourians, G. G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agentes. Review. *Biotechnology Advances*, 13(3): 455-490.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990: *The ants*. – The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA, 732 pp.
- James, R. R.; Buckner, J. S.; Freeman, T. P. 2003. Cuticular lipids and Silverleaf Whitefly stage affect conidial germination of *Beuveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrat Pathology*. V. 84, p. 67-74.
- Jarrold , S. L.; Moore, D.; Potter, U.; Charnley, A. K. (2007). Contribution of surface waxes to pre-penetration gruth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Reseach*. 111:240-249.
- Kim, J. S.; Skinner, M.; Parker, B. L. (2010). Plant oils for improving thermotolerance of *Beauveria bassiana*. *Journal Microbiology Biotechnology*. V.20, n.9, p. 1348-1350.
- Kosir, J. M., MacPherson, J. M., y Khachatourians, G. G. (.1991). Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphism. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 534-541.
- Krieger, De Moraes, C. ; Schrank, A.; Vainstein, M. H. (2003). Rgulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46:205-210.
- Lord, J.C. & Howard, R.W. (2004). A proposed role of the cuticular fatty amides of *Lipocelis botrychophila* (Psocoptera: Lipocelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*. 158:211-217.
- Monteiro, A.F.M. Togni, P. H. Sujii, E. R. 2008. *Biologia de Labidus coecus em agroecossistema de tomateiro orgânico no Distrito Federal*. CD ROM dos resumos do XXCongresso Brasileiro de Zoologia.
- Moraes, C.K.; Schrank, A. Vainstein, M.H. (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, v.46, n.3, p.205-210.
- Nahar, P.; Ghormade, V., Deshpande, M. V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: Possible edge to entomopathogenic fungi in the biological controlo f insect pests. *Journal Invert. Pathol.* 85:80-88.
- Nicholson, W.L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H.J.; Setlow, P. (2000). Resistence of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.3, p.548-572.



- Pedrini, N.; Crespo, R.; Juarez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology part: Toxicology and Pharmacology*. 146:124-137.
- Rangel, D. E.; Anderson, A. J.; Roberts, D. W. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*. V.90, n.1, p. 55-8.
- Rangel, D.E.; Butler, M.J.; Torabinejad, J.; Anderson, A.J.; Braga, G.U.; Day, A.W.; Roberts, D.W. (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal Invertebrate Pathology*. V.93, n.3, p.170-82.
- Robert, A. & AL Aidroos, K. M. (1985). Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of *in vitro* amylase, protease and lipase activity. *J. Invert. Pathol.* 45:9-15.
- Roberts, D.W.; Flint, S.D. (2002). Tools of the UV trade light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). In: *International Colloquium on Insect Pathology and Microbial Control, Londrina. Proceedings...* Londrina: 2002, p.237-240.
- Silva, W. O. B.; Mitidieri, S.; Schrank, A.; Marilene Henning Vainstein, M. H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40: 321–326.
- Sitch, J.C. & Jackson, C.W. (1997) Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. *Mycology Research*, 101, 535-541.
- Soza-Gomez, D. R.; Boucias, D. G.; Nation, J.I. (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69:31-39.
- St Leger, R. J.; Staples, R. C. ; Roberts, D. W. (1992b). Cloning and analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 120:119-124.
- St. Leger, R.J. (1995). The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, v.73, n.1, p.1119-1125.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1991b). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, p.415-426.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1993). Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 139:237-243.

- St. Leger, R.J.; Butt, T.M.; Staples, R.C.; Roberts, D.W. (1989). Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, v.13, p.253-262.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986b). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.295-302.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986c). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1987a). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.253, p.221-232.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1986a). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.167-177.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1987b). Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.258, p.123-131.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1987c). Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*. 133:1371-1382.
- St. Leger, R.J.; Durrands, P.K.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1988a). Role of
- St. Leger, R.J.; Frank, D.C.; Roberts, D.W.; Staples, R.C. (1992a). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*, v.204, p.991-1001.
- St. Leger, R.J.; Goettel, M.; Roberts, D.W.; Staples, R.C.; (1991). Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, p.168-179.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996a). Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.4, p.1257-1264.

- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996b). Characterization and ultrastructural localization of chitinase from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environment Microbiology*. 62:907-912.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Roberts, D.W. (1996c). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:6349-6354.
- Stehr, F.; Kretschmar, M.; Kröger, C.; Hubea, B.; Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22: 347–355.
- Szafranek, B.; Maliński, E.; Nawrot, J.; Sosnowska, D.; Ruszkowska, M.; Pihlaja, K.; Trumpakaj, Z.; and Szafranek, J. (2001). In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Arkivoc*. V.3, p. 81-94.
- Tiago, PV. and Furlaneto, MC., (2003). O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, vol. 2, no. 1, p. 40-51.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103:6647-6652.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2007a). The *Metarhizium anisopliae* Perilipin homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, aressorial turgor pressure and virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 21110-21115.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2007b). The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insect, and the MAD2 adhesion enables attachment to plants. *Eukariotic Cell*. 6:808-816.
- Zimmermann, G. (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v.40, n.1, p.36-40.

### **3. TRABALHOS**

#### **FATORES AMBIENTAIS E CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS EM RELAÇÃO À VIRULÊNCIA A *D. opuntiae***

##### **RESUMO**

Enfatizando o controle biológico e o estudo dos fungos entomopatogênicos como agentes eficientes em condições de campo, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial dos fungos entomopatogênicos no controle da cochonilha do carmim. O estudo da tolerância dos fungos entomopatogênicos a fatores ambientais é de suma importância e pode ser utilizado como parâmetro de seleção para auxiliar os testes de patogenicidade e virulência, possibilitando assim um melhor desempenho dos isolados em condições de campo onde são efetivamente requeridos. Os resultados referentes à tolerância dos isolados à radiação solar e ultravioleta artificial revelam que todos os isolados testados são sensíveis à radiação natural. Uma possível explicação para este evento pode estar ligado ao fato de que estes mesmos isolados apresentaram sensibilidade a temperaturas elevadas a partir de 35°C. Considerando que os testes de campo foram realizados em horário de pico de radiação e temperatura, esse baixo desempenho pode ser perfeitamente justificado. Uma vez que nos tratamentos sob radiação UV artificial os isolados testados se mostraram mais tolerantes, vale ressaltar que entre outros fatores relevantes que diferenciam os dois ambientes, quando expostos à radiação artificial foram mantidos todo tempo a 28°C, temperatura

considerada ideal para o desenvolvimento destes fungos. É importante ressaltar que os isolados apresentaram uma recuperação nos índices de germinação com o aumento de tempo de incubação indicando uma relativa capacidade de reparar os possíveis danos causados pela radiação seja de fonte natural (solar) ou artificial. Considerando todos os fatores estudados neste trabalho, os isolados mais promissores quanto à tolerância à radiação solar são LCB55 e LCB62 apresentando respectivamente 83,9% e 15,4% germinação às 48 h de incubação. Quanto à tolerância a temperaturas os isolados com melhor desempenho foram LCB61 e LCB62 apresentando respectivamente 88,28% e 35,15% de germinação aos 30 °C. Vale ressaltar que o isolado LCB61 mostra-se superior ao LCB62 também aos 35 °C onde apresenta 85,24% de germinação, enquanto que o isolado LCB62 não apresenta germinação nesta faixa de temperatura. Outra característica estudada como possível fator de virulência para os isolados testados foi a atividade enzimática. Os resultados mostraram que os níveis mais elevados de atividade de tripsina foram associados com isolado LCB53. Cinco atividades proteolíticas foram visualizadas com uma gama de massas moleculares usando geis de atividade SDS-PAGE. Os isolados LPP19 e LCB55 expressaram duas principais proteases de elevada massa molecular, embora com menor atividade global que LCB53. Quanto aos isolados LCB52 e LCB62 apenas demonstraram atividade traço "em gel". No entanto, atividade de lipase foi detectada apenas em filtrados da cultura de LCB62 e LCB55 quando utilizado azeite como substrato. Analisando todos os fatores estudados e associando-os ao potencial dos isolados como agentes de biocontrole de *D. opuntiae* pode-se inferir que os isolados LCB62 e LCB55 apresentam o melhor desempenho em relação aos fatores limitantes em condições de campo tais como potencial de recuperação dos danos causados pela radiação solar e ainda tolerância mesmo que insipiente a temperaturas elevadas, considerando ainda o aparato enzimático estes isolados também demonstram desempenho considerável.

## ABSTRACT

Emphasizing the biological control and the study of the entomopathogenic fungi as efficient agents in field conditions, the objective of this work was to investigate the potential of the entomopathogenic fungi for the control of the scale insect *Dactylopius opuntiae*. The study of the tolerance of the entomopathogenic fungi to environmental factors is important and can be used as selection parameter to aid in pathogenicity and virulence tests, indicating the best isolates for use in the field. The results for tolerance of the isolates to solar and artificial ultraviolet radiation reveal that all the isolates tested are sensitive to natural radiation. A possible explanation for this could be linked to the fact that these isolates were also sensitive to temperatures above 35°C. Considering that the field tests were carried out under natural radiation and temperature conditions, lower germination rates were justified. Artificial UV radiation showed that the isolates tested were more tolerant, although it should be noted that isolates exposed to artificial radiation were maintained at 28°C, a temperature considered ideal for the development of these fungi. It is important to emphasize that the isolates showed a recovery in the germination rates with increasing incubation time, indicating a relative capacity to repair the possible damages caused by the radiation, natural (solar) or artificial. Considering all the factors studied in this work, the more promising isolates considering tolerance to the solar radiation were LCB55 and LCB62, presenting 83.9% and 15.4% germination respectively following a 48 h incubation period. As for the tolerance to temperatures, the isolates the best performance were LCB61 and LCB62 presenting 88.28% and 35.15% germination respectively at 30°C. It is worth emphasizing that isolate LCB61 was superior to LCB62 also at 35°C where it presents 85.24% germination, while isolate LCB62 did not germinate at this temperature. Another characteristic studied as possible virulence factor for the isolate was their enzymatic activity. The results showed that the highest levels of trypsin activity were associated with isolate LCB53. Five proteolytic activities were visualized with a range of molecular masses using SDS-PAGE activity

gels. Isolates LPP19 and LCB55 expressed two major proteases of high molecular mass, although with lower general activity than LCB53. Isolates LCB52 and LCB62 demonstrated trace "in gel" activity. However, lipase activity was only detected in filtrates of LCB62 and LCB55 when used olive oil as a substrate. Analyzing all the factors studied and associating them to the potential of the isolates as biocontrol agents of *D. opuntiae*, it can be inferred that isolates LCB62 and LCB55 present the best correlation to the limiting factors under field conditions such as potential of recovery from damage caused by solar radiation and incipient tolerance to high temperatures, and considering the enzymatic profile these isolates as potential candidates for use against this pest species.

## INTRODUÇÃO

A cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* tem devastado os plantios de palma forrageira e estima-se que os prejuízos tenham atingido aproximadamente R\$ 140 milhões (Bahe, 2007). Pouco se sabe a respeito de medidas de controle da cochonilha do carmim no Brasil.

As áreas afetadas apresentam características excelentes para o desenvolvimento de *D. opuntiae*, pela incidência elevada de insolação e radiação solar, resultando em altas temperaturas e umidade relativa baixa durante a maior parte do ano. Aliado às características ambientais favoráveis, *D. opuntiae* apresenta ainda elevado potencial biótico. Devido à inexistência de medidas eficazes de controle que não acarretam o risco de contaminação por resíduos na produção de carne, leite e derivados, algumas alternativas de controle têm sido estudadas, dentre elas a utilização de fungos entomopatogênicos buscando manter as populações da praga abaixo do nível de dano econômico, possibilitando o cultivo sustentável da palma forrageira nas regiões atacadas (Carlos Gava, Embrapa, comunicação pessoal).

Os FE apresentam algumas particularidades que os diferenciam dos demais patógenos tais como bactérias e vírus. Os FE infectam uma vasta gama de hospedeiros nos mais diversificados ambientes seja aquático, parte aérea de plantas e até insetos abrigados no interior do solo (Hajek & St. Leger, 2004). Além de sua capacidade de infectar várias espécies de insetos e ácaros, atingindo todos os estágios de desenvolvimento do hospedeiro penetrando por diversas vias predominantemente pelo tegumento sendo também capaz de se dispersar horizontalmente (Alves & Lopes 2008), outro aspecto relevante é a variabilidade genética desses entomopatógenos, podendo ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos (Alves, 1998). No entanto, vários fatores ambientais como a radiação ultravioleta, pluviosidade, pH, temperatura, umidade relativa entre outras características das áreas afetadas limitam a eficácia dos entomopatógenos. Além dos fatores ambientais, também devem ser considerados algumas características da praga em questão como a presença de espessa camada de ceras altamente



hidrofóbicas que dificultam a penetração de produtos diversos e limita a adesão dos fungos entomopatogênicos.

Quando se considera as condições de campo onde os entomopatógenos são mais suscetíveis, os fatores ambientais devem ser cuidadosamente examinados. Após a pulverização os entomopatógenos serão expostos a fatores bióticos e abióticos que podem comprometer sua sobrevivência, propagação e até mesmo o processo de infecção do hospedeiro (Goettel et al., 2000). Dentre os fatores bióticos e abióticos capazes de afetar significativamente os entomopatógenos se destaca a radiação solar UV (Fargues et al., 1996; Cagan e Svercel, 2001; Braga et al., 2001b). A radiação solar UV pode inativar conídios, causar danos letais ao seu DNA e provocar mutações (Nicholson et al., 2000). Conforme relatado em diversos estudos, a radiação UV pode reduzir significativamente a eficácia de fungos no campo (Braga et al., 2001a). A exposição aos fatores ambientais (temperatura, umidade, radiação solar, etc.) tem se mostrado determinante para a estabilidade dos entomopatógenos (RANGEL et al., 2005).

A temperatura também é um fator de grande importância e atua sobre os patógenos afetando sua produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo. Esse fator torna-se ainda mais importante, tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura através de sistemas fisiológicos (Alves, 1982). A viabilidade e atividade biológica de fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pela temperatura, umidade, substrato, radiação ultravioleta e outros fatores (Batista Filho & Cardelli, 1986; Alves et al., 1987). A persistência de um entomopatógeno no habitat depende basicamente de três fatores: tipo de substrato em que o patógeno está localizado, fatores ambientais e forma do patógeno em presença ou não de estruturas de resistência. Porém Rangel et al., 2005, em seus estudos com isolados de diferentes regiões geográficas constataram que a região de origem dos isolados também influencia na sua tolerância a altas temperaturas e conforme seus resultados os isolados provenientes de regiões próximas ao equador demonstraram maior tolerância que os demais quando expostos a temperaturas elevadas.

As radiações podem ser benéficas, malélicas ou inócuas para os fungos dependendo da qualidade e intensidade da radiação, tempo de exposição, etc.

Quando as radiações não causam efeitos letais, normalmente influenciam o crescimento e a reprodução. Estudos em laboratório e campo sugerem que a luz solar, em especial a porção ultravioleta do espectro, é provavelmente o fator que mais afeta a persistência de inseticidas microbianos, pois atua diretamente nos ácidos nucléicos, alterando-os ou mesmo destruindo, o que impede o crescimento e a multiplicação do microrganismo (Valle, 1984).

A radiação solar também pode causar perda de viabilidade desse fungo. Corrêa (1983) demonstrou que a luz solar direta causa altas taxas de mortalidade de conídios, exceto aqueles que são mais protegidos sob luz difusa nos poros do solo. Zimmermann (1982) estudando o efeito de lâmpadas artificiais com o mesmo espectro de ação da luz solar e com potência dez vezes maior, constatou que a luz diminui e retarda a germinação de conídios. O método menos utilizado é o da radiação natural, dada a sua alta variação ao longo do tempo, o que dificulta as pesquisas com microorganismos a respeito da tolerância ao UV e seus efeitos (Roberts & Flint, 2002). Alguns autores sugerem selecionar isolados mais tolerantes à radiação UV-B, pois se sabe que a suscetibilidade dos fungos à radiação varia entre diferentes espécies e entre isolados (Fargues et al., 1996). O grande desafio dos trabalhos é encontrar isolados pelo menos tolerantes à radiação UV-B, ou seja, que mantenham a viabilidade e a virulência quando expostos (Cagan & Svercel, 2001; Braga et al., 2001c).

Embora existam limitações para o uso dos fungos entomopatogênicos, impostas pelo ambiente, estes têm conquistado espaço no mercado. Alguns programas de controle microbiano bem-sucedidos pelo mundo e a demanda cada vez maior de produtos menos poluentes ao meio ambiente reforçam esta tendência. O mercado latino-americano de micoinseticidas vem expandindo embora de modo ainda insipiente, considerando que a venda de produtos a base de fungos não supere US\$ 20 milhões por ano na América Latina. No Brasil, no entanto o faturamento com micoinseticidas 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 & Lopes, 2008).

Considerando-se as interações fungo, hospedeiro e ambiente, a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de uma praga é uma das etapas mais importantes para a determinação da virulência, aspectos reprodutivos e produção em meio de cultura artificial, para a posterior utilização como bioinseticida, (Almeida & Batista Filho 2001). Diversos autores têm demonstrado a importância da seleção de isolados de fungos entomopatogênicos no controle de pragas, revelando que a variabilidade genética desses microrganismos constitui-se no grande potencial para o controle de pragas, além de não haver necessariamente uma ligação direta do isolado com o hospedeiro e local com a virulência do mesmo (Batista Filho *et al.* 2002).

Diversos eventos compõem o ciclo das relações fungo-hospedeiro tais como adesão, germinação, formação do apressório e grampo de penetração, penetração, colonização e reprodução. Durante estes eventos os fungos entomopatogênicos apresentaram fatores de virulência, incluindo a produção de enzimas. Estudos relacionados à produção, regulação, clonagem e ao seqüenciamento destas enzimas em especial as proteases têm sido realizados, e permitirão a elucidação dos fatores envolvidos na interação fungo-hospedeiro.

O processo de adesão depende da presença de enzimas (esterases e proteases) que ocorrem na superfície dos conídios não germinados e que atuam na superfície do tegumento do inseto hospedeiro, possibilitando a nutrição e germinação do fungo (St. Leger *et al.*, 1991).

Alguns aspectos estão intimamente ligados ao processo de adesão do conídio na cutícula do inseto. Conforme verificado por Sitch & Jackson (1997), fatores envolvidos na infecção podem variar entre as diferentes espécies de hospedeiro potencial. Em alguns casos, a incapacidade dos esporos permanecerem na cutícula por um período de tempo suficiente que permita sua germinação e penetração é um fator limitante. Em outros, embora a velocidade e a quantidade de conídios germinados sejam semelhantes entre espécies de insetos suscetíveis ou não, a disponibilidade de nutrientes ou estímulos inadequados para a penetração pode juntamente com outros fatores, impedir a infecção. Existem ainda relatos da interferência de microclima da superfície da cutícula, bem como seu relevo, hidrofobicidade, e ainda a

competição com a microflora (fungos e bactérias) presente na superfície da cutícula do hospedeiro entre outros (St. Leger, 1991).

Uma infecção pode não ocorrer se algum fator essencial estiver ausente durante a aderência, desenvolvimento ou colonização (St. Leger 1991). A infecção pode ser afetada pela baixa umidade (fungos requerem água para a germinação e a ampliação do crescimento), uma inabilidade para utilizar nutrientes disponíveis sobre a cutícula superfície, ou a ausência de fatores necessários para o reconhecimento de um sítio adequado para penetração e infecção si (Hajek & St. Leger 2004).

De acordo com relatos de St. Leger (1992), quanto maior o grau de especificidade do fungo com relação ao seu hospedeiro, maiores as exigências quanto a condições especiais durante o processo de germinação para que este seja bem-sucedido.

Muitos dos trabalhos ressaltam o papel das proteases no processo de infecção de insetos por fungos, estando estas proteases envolvidas na hidrólise dos componentes cuticulares predominantemente de proteínas, facilitando a penetração da hifa através da cutícula de insetos. Portanto, é de grande relevância a compreensão de como a produção dessas enzimas é regulada nos mais diversos processos fisiológicos, e como o tipo de substrato influencia sua expressão. Os estudos relacionados a determinantes de virulência de FE poderão permitir um maior entendimento dos fatores envolvidos na interação fungo -hospedeiro.

As proteases extracelulares promovem a hidrólise dos componentes cuticulares, facilitando a penetração da hifa através do tegumento de insetos. Segundo Tiago & Furlaneto, 2003, a endoprotease tipo subtilisina designada Pr1 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* vem sendo considerada o melhor modelo de determinantes de patogenicidade em FE. De acordo com estes autores, foram caracterizadas em *M. anisopliae* var. *anisopliae* além de Pr1, uma protease tipo tripsina designada Pr2, duas aminopeptidases extracelulares, uma metaloprotease e uma cisteína protease designada Pr4.

A penetração dos FE através do tegumento ocorre, em parte, pela ação de enzimas, especialmente as proteases. Em estudos realizados por St. Leger et al. (1986a; 1986c) foi observada a produção das enzimas extracelulares (endoproteases, aminopeptidases, lipases, esterases e quitinases) em grandes

quantidades por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium lecanii* quando crescidos em cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. Além disso, foi observada uma grande variação nos níveis de produção enzimática entre os diferentes isolados, porém todos os isolados apresentaram alta produção de endoproteases.

A partir de uma protease purificada (Pr1) de *M. anisopliae* var. *anisopliae* St. Leger et al., (1986a) verificaram a remoção de 25–30% das proteínas cuticulares, sugerindo a participação das proteases na hidrólise da cutícula, possibilitando a penetração da hifa através da mesma.

Gillespie et al. (1998) relatam a produção de proteases extracelulares por isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* (*M. flavoviride*) utilizando cutícula de pupa de *M. sexta* e cutícula de diferentes partes do tegumento de *S. gregaria* (cutícula abdominal de ninfas de quinto instar, cutícula abdominal do inseto adulto e cutícula das asas) que compreendem tipos cuticulares com composição protéica e grau de esclerotização distintos.

Outas enzimas importantes no processo de infecção por fungos entomopatogênicos são as lipases e esterases capazes de hidrolisar lipídios cuticulares de insetos (Bidochka et al., 1997). A impossibilidade de utilizar lipídios presente sobre a superfície da cutícula dos artrópodes pode reduzir a virulência de alguns fungos. Estes lipídeos contribuem para a especificidade do patógeno-hospedeiro (St Leger, 1993; Kosir et al., 1991). A importância de lipases está relacionada essencialmente à especificidade patógeno-hospedeiro (Hegedus & Khachatourians, 1995).

As primeiras enzimas comprovadamente secretadas pelos fungos entomopatogênicos no início da penetração da cutícula de seus hospedeiros são as proteases. No entanto, é possível que as lipases precedam as proteases devido à camada de composição lipídica presente na epicutícula dos artrópodes (St Leger et al., 1986a; St Leger et al., 1991b; Clarkson & Charnley, 1996; Silva et al., 2005). Entretanto, pouco tem sido relatado em relação a estas enzimas comprovadamente secretadas por *M. anisopliae* (Silva et al., 2005).

O primeiro trabalho específico relatando a produção de lipases por *M. anisopliae* foi realizado por Silva et al., (2005). Antes deste trabalho, porém

foram relatadas apenas detecções pontuais da atividade de lipase em FE (Robert & Aidroos, 1985; St Leger et al., 1986 c; Nahar et al., 2004).

A produção de lipases pode estar relacionada com o fator de virulência para fungos entomopatogênicos, visto que há relatos da inibição da germinação de esporos de *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* por componentes das ceras produzidas por *Bemisia argentifolii* (James et al., 2003). Neste trabalho foi evidenciado que a germinação de conídios foi mais efetiva em cutículas de insetos entre o segundo e o terceiro instar apresentando 54% e 45% de germinação respectivamente, enquanto que cutículas de insetos do quarto instar em diante foram pouco sensíveis ao fungo apresentando apenas 7% dos conídios de *B. bassiana* germinados e mediana sensibilidade a *P. fumosoroseus* com 33% de seus conídios germinados.

Assim, embora observado o efeito sobre a germinação de conídio pela espessa camada de cera de ésteres de cadeia longa produzido pelas ninfas de mosca branca sobre *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*, seu papel na defesa a patógenos ainda não é claro (James et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Szafrank et al., (2001) revelando o efeito inibitório de lipídios presentes em exoesqueletos dos pulgões *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* e *Brevicoryne brassicae* sobre *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*.

Devido à complexidade da cutícula dos insetos, os patógenos que penetram por estas vias, tais como os fungos entomopatogênicos, produzem enzimas hidrolíticas como lipases, proteases e quitinases, as quais possibilitam a penetração via cutícula de seus hospedeiros (St Leger, et al., 1996a; St Leger, et al., 1996b; Krieger de Moraes et al., 2003).

A relação entre a virulência dos fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula vem sendo investigada. Muitos genes e enzimas têm sido caracterizados e estudados visando verificar sua participação no processo de infecção (St Leger et al., 1986 a ; Bidochka & Kachatourians, 1988; Bogo et al., 1998; Moraes et al., 2003; Silva et al., 2004; Bittencourt et al., 2004).

Com base nas informações relacionadas aos eventos envolvidos durante o processo de infecção por fungos entomopatogênicos e a complexidade de controle de *D. opuntiae*, foram desenvolvidos alguns ensaios visando elucidar algumas questões e melhor direcionar as medidas de controle desta praga

usando fungos entomopatogênicos. Os ensaios envolvem questões relativas ao potencial biótico dos fungos entomopatogênicos e às condições ambientais a que se destinam, sendo assim os objetivos deste trabalho foram:

- I- Verificar a tolerância dos fungos testados sobre *D. opuntiae* a radiação ultravioleta natural e artificial;
- II- Avaliar o efeito da temperatura na germinação e crescimento vegetativo dos fungos entomopatogênicos testados sobre a cochonilha do carmim;
- III- Investigar a atividade enzimática entre os fungos entomopatogênicos testados sobre *D. opuntiae*, com ênfase nas proteases e lípases;
- IV- Investigar uma possível relação entre a produção de enzimas a virulência dos fungos testados a *D. opuntiae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Bioensaio 1 - Tolerância dos fungos testados sobre a cochonilha do carmim a radiação solar e ultravioleta artificial**

Neste bioensaio foram estudados os isolados que demonstraram melhor desempenho quanto à virulência sobre *D. opuntiae* em experimentos anteriores. Devido às condições ambientais em que tais isolados foram avaliados, sendo predominantemente baixa umidade relativa do ar e com alta incidência de radiação ultravioleta foi adicionado óleo vegetal (8%) à calda, visando minimizar os efeitos de tais fatores nos fungos em estudo.

Os isolados selecionados foram submetidos à radiação solar e artificial em câmara de fluxo laminar sob lâmpada UV de 15w, comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 245nm (G15T8) durante 5 minutos. O período de exposição à lâmpada UV foi estabelecido em ensaios preliminares. As condições experimentais sob radiação solar foram em horário de pico de radiação e temperatura das 12 h às 14 h e no laboratório com temperatura média em torno de 25 graus.

Para ambos os experimentos foram avaliados 14 isolados. As suspensões de fungos foram padronizadas na concentração  $1 \times 10^8$  conídios ml<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> foram retiradas alíquotas de 50 µl, em seguida esta alíquota foi espalhada no fundo de uma placa de petri com o auxílio de uma alça de Drigalski, sendo 3 placas por isolado formulado com óleo vegetal e Triton X100 (0,05%), ou com apenas espalhante adesivo Triton X100 (0,05%), estas placas foram mantidas em condições de laboratório até secar o excesso de água da mistura. Após a secagem as placas foram expostas às condições experimentais. Após a exposição às condições experimentais as placas foram levadas para uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada e realizada a resuspensão dos conídios com Triton X100 0,05% (500 µl) com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida foram retiradas alíquotas de 50 µl da resuspensão e aplicadas em campos circulares delimitados em lâminas de vidro contendo uma fina camada de meio BDA (3 lâminas por isolado). Estas lâminas foram acondicionadas em placas de petri estéreis e devidamente lacradas para posterior incubação em câmara de germinação tipo BOD por diferentes tempos sendo 16, 24 e 48 horas. Após os períodos de incubação o processo germinativo foi interrompido utilizando uma solução de ácido láctico e azul de metileno. Posteriormente foi verificada a porcentagem de germinação dos conídios em função da exposição à radiação solar e ultravioleta e do tempo de incubação dos conídios em meio BDA quando expostos às condições experimentais.

As avaliações constavam de contagens do número de conídios germinados por campo de visão em microscópio óptico, com aumento de 400 vezes. As amostragem por campos de visão consistiam de 150 conídios por disco, sendo 3 discos por lâmina e 3 lâminas por isolado em cada tratamento em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo com o dobro do tamanho do conídio.

As condições experimentais foram dispostas em 14 tratamentos abaixo descritos na tabela 1:

Tabela 1. Descrição dos tratamentos para avaliação da tolerância dos fungos testados sobre a cochonilha do carmim a radiação solar e ultravioleta artificial



Tratamentos	Condições experimentais				Tempo de incubação em meio BDA (25°C)
	Extração de conídios	Formulação	Exposição a UV		
			Artificial	Natural	
1	Triton X100 0,05%	Surfactante Triton X100 0,05%	Não exposto	Não exposto	16 horas
2	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%	Não exposto	Não exposto	16 horas
3	Triton X100 0,05%	Surfactante Triton X100 0,05%	Exposto	-	16 horas
4	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%	Exposto	-	16 horas
5	Triton X100 0,05%	Surfactante Triton X100 0,05%	-	Exposto	16 horas
6	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%	-	Exposto	16 horas
7	Triton X100 0,05%	Surfactante Triton X100 0,05%	Exposto	-	24 horas
8	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%	Exposto	-	24 horas
9	Triton X100 0,05%	Surfactante Triton X100 0,05%	Exposto	-	48 horas
10	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%	Exposto	-	48 horas

11	Triton X100 0,05%	Surfactante Triton X100 0,05%		Exposto	24 horas
12	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%		Exposto	24 horas
14	Óleo de girassol	Óleo de girassol (8%) e surfactante Triton X100 0,05%		Exposto	48 horas

Os resultados deste experimento foram submetidos à Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

### **Bioensaio 2 - Efeito da temperatura na germinação dos fungos entomopatogênicos testados sobre a cochonilha do carmim**

Conforme descrito por diversos autores a temperatura influencia o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos, chegando em alguns casos a ser um sério limitante em condições de campo.

Foram realizadas padronizações dos isolados em Triton X100 0,05%, sendo obtidas suspensões  $1 \times 10^8$  conídios/ mL, em seguida foram retiradas alíquotas de 50  $\mu$ l desta suspensão e aplicadas em campos circulares delimitados em lâminas de vidro contendo uma fina camada de meio BDA (3 por isolado). Estas lâminas foram acondicionadas em placas de petri estéreis e devidamente lacradas para posterior incubação por 18 horas em câmara de germinação tipo BOD em diferentes temperaturas, sendo 28°C (tratamento controle); 30°C; 35°C e 40°C. Após o período de incubação nas referidas temperaturas o processo germinativo foi interrompido utilizando uma solução de ácido láctico e azul de metileno e posteriormente verificada a porcentagem de conídios germinados e não germinados em função da temperatura de incubação.

As amostragens por campos de visão consistiam de 150 conídios germinados e não germinados por campo de visão em microscópio óptico, com aumento de 400 vezes, sendo 3 discos por lâmina e 3 lâminas por isolado em cada tratamento em delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo com o dobro do tamanho do conídio.

### **Bioensaio 3 - Produção de protease e lipases pelos fungos entomopatogênicos testados sobre *D. opuntiae***

Este estudo buscou caracterizar isolados de fungos entomopatogênicos com alta virulência contra a cochonilha *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae), uma séria praga da palma no NE do Brasil, utilizando como

substratos lipase e protease e correlacionar a atividade enzimática como um possível fator de patogenicidade, devido ao fato desta cochonilha produzir uma secreção cerosa protetora que dificulta o processo de infecção por fungos.

## 1. Meio de cultura

Para realização dos ensaios de atividade proteolítica, os isolados mais promissores nos ensaios de virulência a *D. opuntiae* foram cultivados em meio líquido contendo cutícula de gafanhoto como fonte de carbono e minerais.

O meio de sais minerais básicos composto por ZnSO<sub>4</sub>(1g/L); NaNO<sub>3</sub> (0,2g/L); CuSO<sub>4</sub> (0,02g/L); MnCl<sub>2</sub> (0,02g/L); FeSO<sub>4</sub>(0,2g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1g/L); MgSO<sub>4</sub> (0,05g/L) e cutícula de gafanhoto (10g/L) como fonte de carbono, foi esterilizado em autoclave por 15 minutos. Foram utilizados erlemeyers de 250 mL, cada um contendo 100 ml do meio de cultivo, sendo três erlemeyers por isolado. Os isolados foram previamente cultivados em meio sólido (SDA) e aos 10 dias de cultivo em SDA, foram preparadas diluições padronizadas de 1x10<sup>7</sup> conídios/ml e retirada uma alíquota de 1ml da suspensão para inoculação no meio líquido. Os erlemeyers foram mantidos sob agitação a 120 rpm. Ao longo do tempo de agitação foram retiradas alíquotas do sobrenadante para análise da atividade proteolítica, sendo os tempos de amostragem aos 2, 4 e 11 dias de incubação. As amostras coletadas foram filtradas e acondicionadas em tubos falcon, em seguida congeladas para posteriores ensaios de atividade enzimática.

## 2- Ensaios de atividade enzimática

Os isolados LCB52; LCB53; LCB55; LCB62 e LPP19, foram cultivados em meio líquido contendo minerais traço e cutícula de gafanhotos como fonte de carbono, mantido em agitação constante. Amostras do sobrenadante foram retiradas após 2, 4 e 11 dias procedendo a sua filtragem, foram realizados ensaios de atividade proteolítica do sobrenadante utilizando Bz-Phe-Val-Arg-NA, Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-NA, SDS-PAGE e géis atividade com gelatina. Atividade de lipase nos respectivos tempos de incubação foi determinada usando um método gravimétrico.

SDS-PAGE, com géis contendo 8% de acrilamida foram utilizados para detecção de enzimas com atividades majoritárias presentes no sobrenadante de meios de cultivo de fungos entomopatogênicos. A atividade proteolítica foi detectada adicionando-se 1,1 ml de solução de gelatina (0,9%) descontando-se este volume de água durante a preparação do gel. Após a lavagem com Triton, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, por 5,5 horas a 30°C. Em seguida o gel foi encubado em solução corante de Coomassie blue R-250 (0,1%) diluído em metanol (40%) e ácido acético (10%) e água destilada por 24 horas.

A atividade proteolítica foi visualizada após lavagem do gel com solução de metanol (40%), ácido acético (10%) e água destilada por alguns minutos que revelou bandas claras em fundo azul.

Atividade de lipase nos respectivos tempos de incubação foi determinada usando método titulométrico adaptado de Brockehoff (1969) utilizando azeite de oliva como substrato. A proteína contida nas amostras do sobrenadante foi estimada pelo método de Bradford (1976), usando-se ovoalbumina para construção da curva padrão.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Bioensaio 1 - Tolerância dos fungos testados sobre a cochonilha do carmim a radiação solar e ultravioleta artificial**

A radiação solar é considerada como o principal agente causador da inativação de entomopatógenos, especialmente na faixa ultravioleta (Edgington et al., 2000; Rangel et al., 2006; Chelico & Kachatourians, 2007).

Dentre as variáveis avaliadas, foram detectadas diferenças significativas pelo teste F ( $P > 0,01$ ) conforme indicado no quadro 1. Sendo assim, os isolados demonstraram diferença entre si, o que já era esperado devido a diferenças de suscetibilidade típicas dos fungos (Fargues et al., 1996) e sua procedência (Rangel et al., 2005; Feng 2009). Havendo também diferença significativa entre os ambientes a que estes isolados foram submetidos à radiação solar

(ambiente natural) e radiação UV artificial (fluxo laminar com lâmpada UV de 15w,  $\lambda = 245\text{nm}$ ), os tempos de incubação em meio BDA e na interação destes fatores.

Quadro 1. Médias de germinação de conídios dos fungos entomopatogênicos (N=14) submetidos à radiação UV artificial e natural em dois formulados (TritonX 100 e Óleo vegetal 0,1%) nos diferentes tempos de incubação (16h; 24h e 48h) em meio BDA.

FV	GL	QM
ISOLADOS	13	6951.1497**
FORMULAÇÕES	1	233.9889
AMBIENTES	1	285886.2163**
TEMPO INCUBAÇÃO	2	12551.9181**
REPETIÇÃO	2	13.4673
ISOL. X FORM.	13	131.0804
ISOL. X AMB.	13	6393.751**
ISOL. X TI	26	1413.4663**
FORM. X AMB.	1	100.7771
FORM. X TI	2	221.8019
AMB. X TI	2	590.6908
ERRO	427	132.8421
CV	38.59638	

\*\* - significativo pelo teste F (  $P > 0,01$ ).

Embora alguns autores relatem o efeito benéfico do óleo vegetal sobre os conídios conferindo proteção a fatores ambientais tais como radiação UV (Alves et al., 1998; Bateman, 1997) e temperatura (Kim, et al., 2010), neste estudo, no entanto, não houve incremento significativo na germinação dos conídios formulados em óleo vegetal (1%) quando comparado aos conídios formulados em espalhante adesivo Triton X 100 (0,05%).

Entretanto, o potencial dos fungos entomopatogênicos no controle da cochonilha do carmim associado com óleo vegetal é perfeitamente justificado devido ao favorecimento da fixação dos esporos sobre as colônias de insetos, visto que as mesmas, por serem cobertas por substâncias gordurosas e

cerosas possuem a capacidade de repelir soluções aquosas. Segundo Carvalho et al. (2005), esta característica bioquímica é uma das responsáveis pela ineficiência de produtos alternativos clássicos, 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.

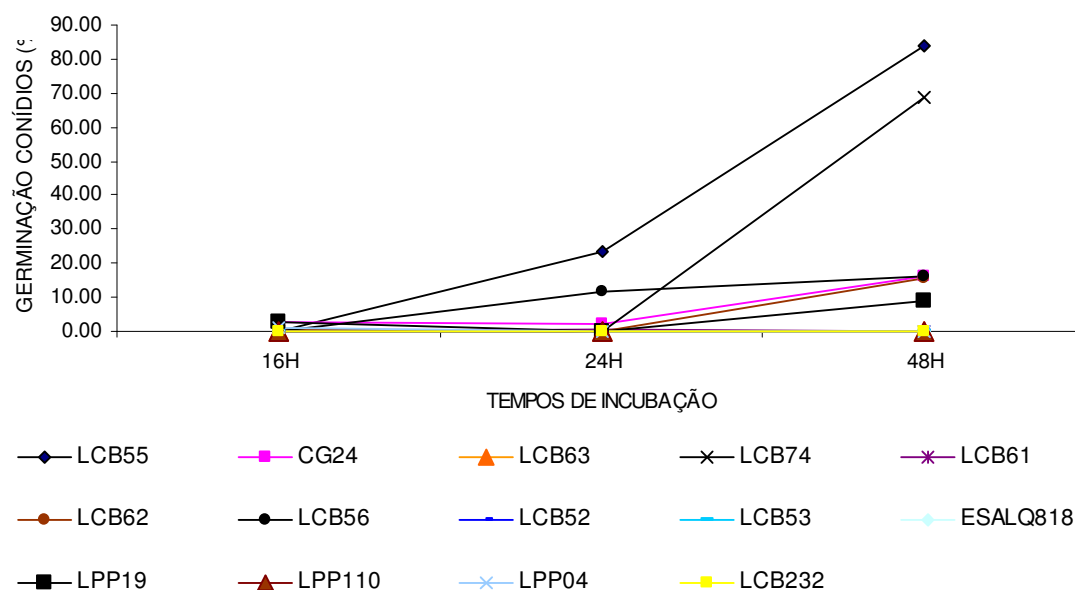


Figura 1. Germinação (%) dos isolados após exposição à radiação solar por 2 horas em diferentes tempos de incubação em meio BDA.

Os isolados submetidos à radiação solar por 2 horas apresentaram germinação significativa às 16 horas de incubação em meio de cultivo BDA, porém a partir deste intervalo de tempo até as 24 horas de incubação houve um incremento nestes índices para os isolados LCB55 e LCB74 culminando às 48 horas de incubação. Embora os isolados tenham apresentado sensível incremento nos índices de germinação à medida que se aumenta o tempo de incubação, não se sabe que efeitos podem ter causado quanto à sua virulência a *D. opuntiae*, já que estes estudos não foram realizados. Francisco (2004) constatou que 2 e 3 horas de exposição ao UV são suficientes para redução drástica da virulência de conídios de *M. anisopliae* quando testados sobre *D. saccharalis*.

Conforme demonstrado na Figura 1 houve um maior número de isolados com índices consideráveis de germinação às 48 horas de incubação, com destaque para os isolados LCB 55, LCB74, seguidos dos isolados CG24, LCB56, LCB62 e LPP19. Os demais isolados não apresentaram índices de germinação nos tempos avaliados, demonstrando maior suscetibilidade à radiação solar direta.

Os resultados representados na Figura 2, demonstram que, de maneira geral, os isolados submetidos à radiação UV artificial (lâmpada UV de 15w,  $\lambda=245\text{nm}$ ), demonstram baixa porcentagem de germinação de conídios após 16 horas de incubação assim como na Figura 1. Enfatizando os isolados que apresentaram porcentagens de germinação acima de 60%, observa-se que os isolados LCB74, LCB52, LPP110, LPP19 e LPP04 se mantêm acima desta faixa independente do tempo de incubação, demonstrando superioridade sobre os demais quanto a este fator. Esses autores encontraram grande variabilidade entre isolados e sugerem sua utilização em programas de melhoramento visando obter linhagens mais resistentes.

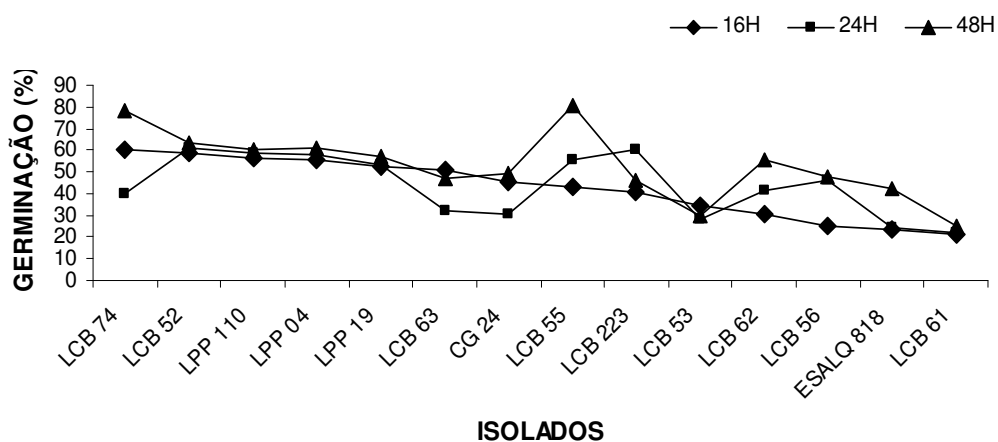


Figura 2. Germinação (%) dos isolados após exposição à radiação sob lâmpada UV de 15w, comprimento de onda de 245nm (G15T8) submetidos a diferentes tempos de incubação em meio BDA (16h; 24h e 48h).

Conforme aumenta o período de incubação, porém surgem outros isolados tais como LCB223 com 90% de germinação às 24h de incubação e os isolados LCB55, LCB56 e LCB62 às 48 h de incubação. Vale salientar que este



fator não é o único limitante ao desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos em condições de campo e que o quanto antes estes fungos forem capazes de se recuperar e/ou quanto tempo mais tolerarem tais fatores, maiores serão as suas chances de sucesso. Estes resultados corroboram com os obtidos por Braga (2002a), demonstrando que algumas espécies de fungos têm mecanismos de proteção natural aos danos causados pela UV, embora a maioria dos microorganismos não possua proteção contra os efeitos deletérios de luz solar.

Alves (1986c), que ao determinar a  $DL_{50}$  da luz ultravioleta germicida (253,7 nm) para vários isolados de *M. anisopliae*, verificou que o tempo de exposição para ocorrerem tais danos varia de 32 a 68 segundos.

Os valores médios de germinação representados na Tabela 2 revelam as diferenças significativas obtidas pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Neste estudo foram obtidos resultados relevantes quanto ao potencial dos isolados testados sobre *D. opuntiae*, apontando possíveis indicativos de quais seriam os mais promissores em se tratando de condições de campo.

Tabela 2. Médias de germinação de conídios dos fungos entomopatogênicos (N=14; 3 repetições) submetidos à radiação UV artificial e natural em dois formulados (TritonX 100 e Óleo vegetal 0,1%) nos diferentes tempos de incubação (16h; 24h e 48h) em meio BDA.

16H				24H				48H						
ISOLADOS	UV ART.		UV NAT.		ISOLADOS	UV ART.		UV NAT.		ISOLADOS	UV ART.		UV NAT.	
LCB74	86.9	Aa	0.00	Ab	LCB 223	90.13	Aa	0.00	Ab	LCB 52	94.25	Aa	0.00	Ab
LCB52	80.34	ABa	0.00	Ab	LCB 52	88.35	Aa	0.00	Ab	LPP110	87.49	Aa	0.00	Ab
LPP110	76.96	ABCa	0.00	Ab	LPP 110	84.50	ABa	0.00	Ab	LCB 223	86.67	ABa	0.00	Ab
LPP19	69.44	ABCa	2.65	Ab	LPP 04	77.31	ABCa	0.00	Ab	LPP 04	86.65	ABa	0.00	Ab
LPP04	69.01	ABCDa	1.11	Ab	LCB 74	65.95	BCDa	0.11	Ab	LPP 19	86.45	ABCa	9.18	Ba
LCB63	59.55	BCDa	0.00	Ab	LPP 19	65.53	BCDa	0.00	Ab	LCB74	72.31	BCDa	69.87	Ba
CG24	48.48	CDEa	2.82	Ab	LCB 24	55.30	CDEa	2.19	Ab	LCB 55	65.14	CDa	83.90	Ab
LCB53	47.08	DEa	0.00	Ab	LCB 56	52.27	DEa	16.33	Ab	LCB62	63.61	CDa	15.40	Ab
LCB55	36.59	E	0.00	Ab	LCB 55	49.25	DEFa	23.64	Ab	LCB 56	62.78	CDa	11.47	Ab
LCB232	30.24	Ea	0.00	Ab	LCB 63	43.50	DEFa	0.00	Ab	ESALQ818	57.14	DEa	0.00	Ab
LCB56	6.24	Fa	0.00	Aa	CG 62	36.19	EFa	0.00	Ab	CG24	47.99	DEa	16.40	Ab
LCB62	2.51	Fa	0.40	Aa	LCB 53	28.11	Fa	0.00	Ab	LCB63	47.71	EFa	0.00	Ab
ESALQ818	0.70	Fa	0.00	Aa	ESALQ 818	2.82	Ga	0.00	Aa	LCB 53	32.80	EFa	0.00	Ab
LCB61	0.58	Fa	0.26	Aa	LCB 61	0.86	Ga	0.55	Aa	LCB 61	11.02	Fa	0.00	Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ )

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ )

Embora haja relatos de efeitos deletérios nos conídios com poucos minutos de exposição, em ensaios realizados por Hunt et al. (1994) e Braga et al. (2001b) mostram isolados de fungos tolerantes, que apresentaram porcentagem de germinação em torno de 60%, após 2 horas de exposição.

Estudos revelam que para as espécies *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*, os efeitos deletérios da exposição ao UV são claramente demonstrados, ocorrendo a redução na viabilidade e na virulência (Inglis et al., 1995; Fargues et al., 1996). Em seus estudos Zimmermann (1982) estimou a meia-vida de *M. anisopliae* em condições de campo em 1 hora e 40 minutos quando se deixou o patógeno incubado por 24 horas e em 2 horas e 45 minutos para 48 horas de incubação.

## **Bioensaio 2 - Efeito da temperatura na germinação dos fungos entomopatogênicos testados sobre a cochonilha do carmim.**

A sensibilidade de fungos entomopatogênicos a altas temperaturas tem sido alvo de muitos estudos, (Kim et al 2010; Rangel, et al., 2010; Fernandes et al 2007). Tendo em vista as condições de estresse térmico a que os isolados testados terão que enfrentar nas condições de campo onde serão requeridos os resultados obtidos nestes ensaios, demonstram seu potencial em variadas faixas de temperatura.

O quadro 2, mostra os resultados da análise de variância para médias de germinação dos conídios submetidos a diferentes temperaturas durante 20 horas. Os resultados revelam diferenças significativas entre os isolados e entre as temperaturas avaliadas pelo teste F ( $P > 0,01$ ).

Quadro 2. Médias de germinação de conídios de fungos entomopatogênicos (N=14) submetidos a diferentes temperaturas, incubação (20h) em meio BDA.

FV	GL	QM
ISOLADOS	13	3138.0011**
TEMPERATURA	3	150737.9854**
REPETIÇÃO	5	6.6672
ISOL. X TEMP.	39	1494.4346**
ERRO	275	54.660
MÉDIA	33.51241	
CV	6.976351	

\*\* Significativo pelo teste F (  $P > 0,01$ ).

Ao observar os resultados obtidos na tabela 3, as médias de germinação do tratamento controle (28°C) apresentavam índices de germinação acima de 90% com exceção ao isolado LCB74 (85,54%). Estes resultados indicam que os conídios submetidos ao teste apresentavam índices de viabilidade relativamente altos. Segundo Alves et al (1986a), as faixas ideais para desenvolvimento de *M. anisopliae* e *B. bassiana* se encontram entre os demais 24 a 30°C, 22 a 26°C, respectivamente.

Tabela 3. Germinação de conídios submetidos a diferentes temperaturas 28°C (tratamento controle), 30°C, 35°C e 40°C (14 isolados/ 3 repetições).

28°C			30°C			35°C			40°C		
LCB53	97,94	A	LCB61	88,28	A	LCB61	85,24	A	LCB61	0	
LPP19	97,94	A	LCB223	63,44	B	LCB53	11,01	B	LCB53	0	
CG24	97,54	AB	LPP04	60,26	B	LCB223	5,24	C	LCB223	0	
LCB223	97,34	AB	LPP19	50,84	C	CG24	3,21	CD	CG24	0	
LPP04	94,37	ABC	LCB52	49,49	C	LPP19	1,01	CD	LPP19	0	
LCB52	93,89	ABC	LCB53	44	D	LPP04	1,01	CD	LPP04	0	
LCB56	93,79	ABC	LCB62	35,15	E	LCB62	0	D	LCB62	0	
LCB55	93,42	BC	LCB63	21,37	F	LCB63	0	D	LCB63	0	
LCB62	93,37	BC	LCB56	12,18	G	LCB52	0	D	LCB52	0	
ESALQ818	93,3	BC	LCB74	8,78	GH	LCB56	0	D	LCB56	0	
LCB63	90,92	C	CG24	7,96	GH	ESAL818	0	D	ESAL818	0	
LCB61	90,87	C	ESALQ818	5,1	HI	LCB55	0	D	LCB55	0	
LPP110	90,76	C	LPP110	3,38	I	LCB74	0	D	LCB74	0	
LCB74	85,54	D	LCB55	0,82	I	LPP110	0	D	LPP110	0	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ )

Analisando as médias obtidas aos 30 °C, observa-se uma queda nos índices de germinação exceto para um isolado *M. anisopliae* o LCB61, que se manteve com níveis de germinação acima de 80% não diferindo entre os tratamentos a 28 °C, 30 °C e 35 °C. Resultados semelhantes foram obtidos por Rangel et al., (2010), onde isolados de *M. anisopliae* demonstraram índices de germinação consideráveis em faixas de temperatura entre 35 e 36 °C, embora o crescimento tenha sido mais lento quando comparado com o obtido aos 28 °C. Entretanto, ao observar o comportamento dos isolados incubados a 40 °C, nenhum dos isolados testados apresentou germinação.

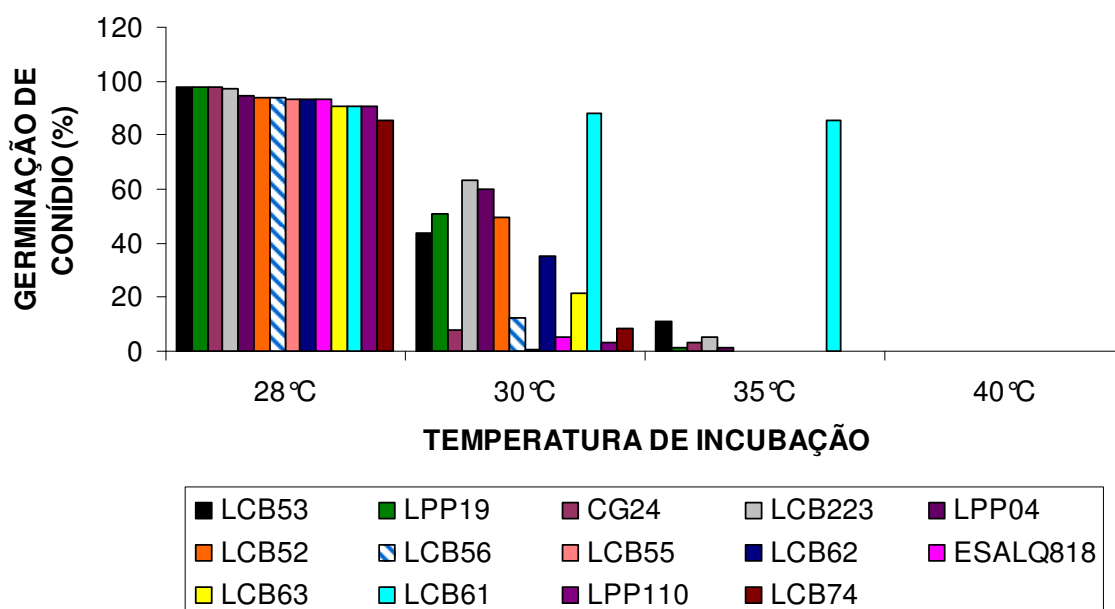


Figura 3. Germinação de isolados de fungos entomopatogênicos submetidos a diferentes temperaturas: 28 °C (tratamento controle), 30 °C, 35 °C e 40 °C, sendo 14 isolados/ 3 repetições

Em ensaios de seleção massal com fungos filamentosos, Crecy et al. (2009) constataram que embora isolados de *M. anisopliae* sejam sensíveis a fatores abióticos como temperatura, esta baixa tolerância pode ser superada por meio de estratégias de adaptação e seleção mediante exposição dos isolados a condições de estresse por repetidos ciclos de produção. Rangel et al. (2010), verificaram ausência de germinação dos isolados quando mantidos por 10 dias em faixas de temperatura entre 38 e 40 °C. No entanto, os autores observaram que a exposição dos conídios a altas temperaturas não causou sua inativação,

pois quando os isolados testados foram retirados deste ambiente de estresse térmico e transferidos para um ambiente a 28°C, todos foram capazes de se recuperar apresentando índices de germinação.

### Bioensaio 3 - Produção de protease e lipases pelos fungos entomopatogênicos testados sobre *D. opuntiae*

Os resultados mostraram que os níveis mais elevados de atividade de tripsina foram associados com isolado LCB53. Geis de atividade SDS-PAGE demonstraram que o isolado LCB53 secreta 5 proteases com uma gama de massas moleculares (Figura 4).

Duas proteases de elevada massa molecular foram expressas pelos isolados LPP19 e LCB55, embora com menor atividade global que LCB53. LCB52 e LCB62 apenas demonstraram atividade traço "em gel". No entanto, atividade de lipase foi detectada apenas em filtrados da cultura de LCB62 e LCB55 quando utilizado azeite como substrato.

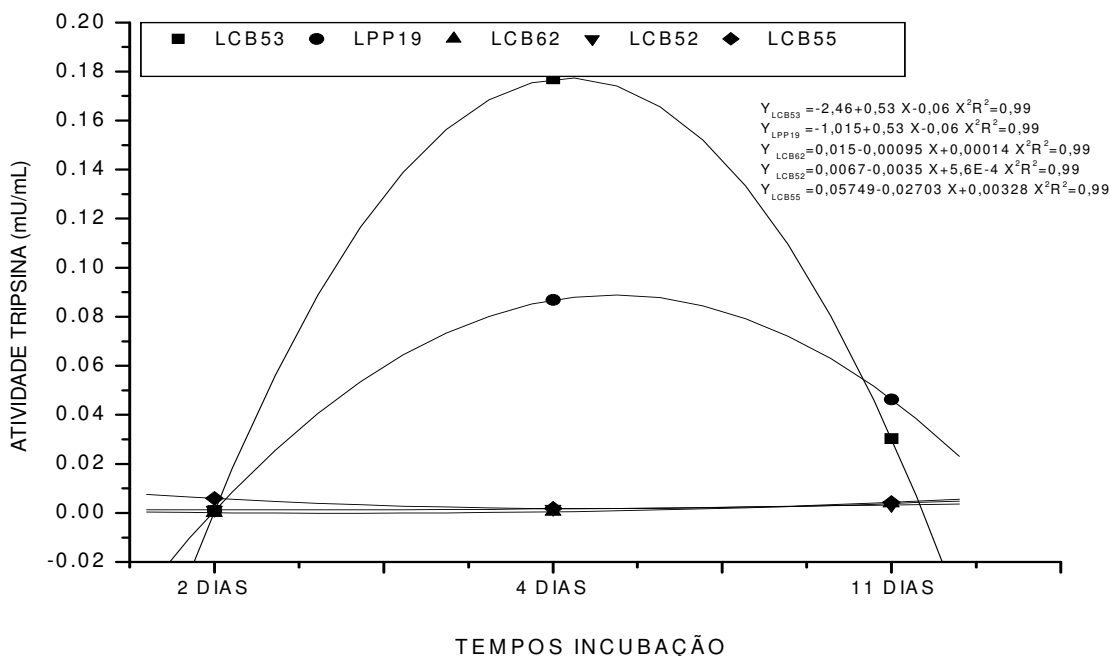


Figura 4. Atividade de Tripsina em sobrenadante de cultivo dos isolados LCB52, LCB53, LCB55, LCB62 e LPP19, expressa em mU/mL.

A atividade de lipase foi detectada apenas em filtrados de LCB62 e LCB55 quando utilizado azeite como substrato. A atividade de lipase foi determinada usando um método titulométrico. Entre os isolados LCB52, LCB53, LCB55, LCB62 e LPP19, foi verificado em bioensaios de virulência diferentes fases de desenvolvimento de *D. opuntiae*, verificou-se que os isolados que apresentam maior atividade enzimática demonstram melhor desempenho, sugerindo assim uma correlação entre seu aparato enzimático e seu potencial como agente de biocontrole desta praga. Alguns autores têm mencionado algo semelhante, já que as enzimas extracelulares podem desempenhar diversas funções relacionadas à degradação dos polímeros que compõem a cutícula do inseto, disponibilizando nutrientes essenciais a nutrição, auxiliando assim, no processo de penetração no hospedeiro( St Leger et al., 1991; Stehr, et al., 2003; Silva et al., 2005).

A cochonilha *D. opuntiae*, possui uma densa camada de cera, sendo assim as enzimas lipolíticas podem estar favorecendo os fungos que as produzem no estágio inicial da infecção conforme sugerido por Göttlich et al. (1995) e Silva et al., (2005).

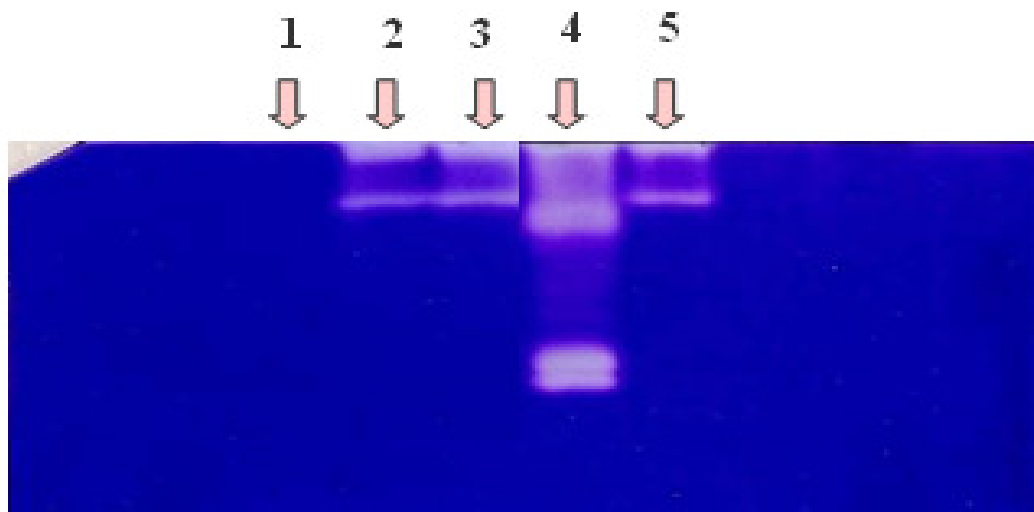


Figura 5. Géis SDS-PAGE atividade proteolítica dos isolados LCB62 (1), LCB55 (2), LCB53 (3), LCB52 (4) e LPP19 (5) em diferentes tempos de incubação (A-2 dias; B- 4 dias e C- 11 dias).

Ao confrontar os resultados obtidos em ensaios de atividade de lipase (figura 6) com os resultados obtidos em ensaios anteriores referentes à patogenicidade e virulência desses isolados a *D. opuntiae*, os isolados que apresentaram maior atividade de lipase estavam entre os isolados que se destacaram no controle de fêmeas adultas da referida praga.

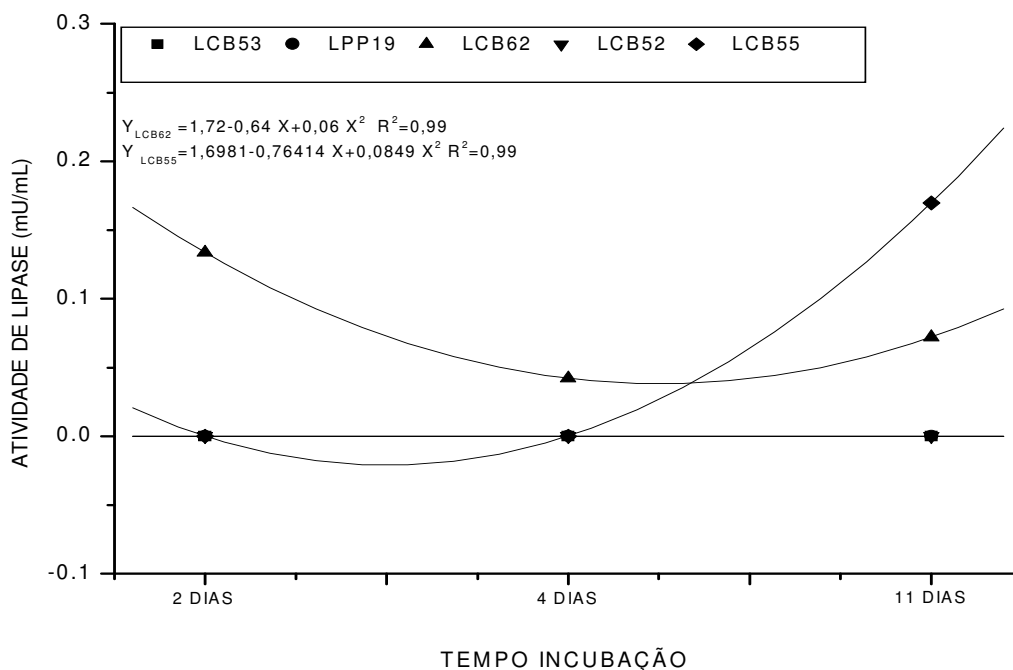


Figura 6. Atividade de Lipase do sobrenadante dos isolados LCB52, LCB53, LCB55, LCB62 e LPP19 expressa em mU/mL.

Segundo St Leger et al., (1991b), enzimas secretadas em meio extracelular podem estar ligadas à degradação de macromoléculas promovendo a liberação de nutrientes metabolizáveis, auxiliando na penetração da cutícula do hospedeiro em processos patogênicos. A produção de lípases pode estar relacionada como fator de virulência para fungos entomopatogênicos, visto que há relatos da inibição da germinação de esporos de *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* por componentes das ceras produzidas por *Bemisia argentifolii* (James et al., 2003), podendo assim estar relacionado com a degradação de componentes tóxicos do substrato.



## CONCLUSÕES

- Os isolados testados apresentaram maior sensibilidade à radiação solar;
- Os isolados apresentaram uma recuperação nos índices de germinação com o aumento de tempo de incubação indicando uma relativa capacidade de reparar os possíveis danos causados pela radiação seja de fonte natural (solar) ou artificial;
- Os isolados mais promissores quanto à tolerância à radiação solar foram LCB55 e LCB62 apresentando respectivamente 83,9% e 15,4% germinação às 48 h de incubação;
- Quanto à tolerância a temperaturas os isolados com melhor desempenho foram LCB61 e LCB62 apresentando respectivamente 88,28% e 35,15% de germinação aos 30°C;
- O isolado LCB61 mostra-se superior ao LCB62 quanto à tolerância à temperatura, pois aos 35°C apresentam respectivamente 85,24% e 0,0% ;
- Os resultados mostraram que os níveis mais elevados de atividade de tripsina foram associados com isolado LCB53, o qual demonstrou 5 proteases com uma ampla gama de massas moleculares em geis de atividade SDS-PAGE;
- Os isolados LPP19 e LCB55 expressaram duas principais proteases de elevada massa molecular, embora com menor atividade global que LCB53;
- Quanto aos isolados LCB52 e LCB62 apenas demonstraram atividade traço "em gel";
- Atividade de lipase foi detectada apenas em filtrados da cultura de LCB62 e LCB55 quando utilizado azeite como substrato;
- Quanto à tolerância a temperaturas elevadas, mesmo que insipiente considerando ainda o aparato enzimático dos isolados LCB62 e LCB55 também demonstram desempenho considerável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, S.B. (1982). Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorok. 95p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Alves, S.B. (1986a). Epizootiologia. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole,. p.29-60.
- Alves, S.B. (1986b). Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole,. p.73-126.
- Alves, S.B. (1986c ). Patologia geral. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole, p.3-70.
- Alves, S.B.; Silveira Neto, S.; Pereira, R.M.; Macedo, N. (1987). Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. *Ecosistema*, Espírito Santo do Pinhal, v.12, p.78-87.
- Alves, B.S. & Lopes, R. B. (2008). Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ. V. 14.p.69-104.
- Almeida, J. E. M. & A. Batista Filho (2001). Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenvolvimento*. 20: 30-33.
- Arruda, W.; Lübeck, I.; Scrank, A.; Vainstein, M.H. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Acarology*. 37:231-244.
- Askary, H., Benhamou, N., & Brodeur, J. (1999). Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74, 1-13.
- ASKARY H., YARMAND H., (2007). Development of the entomopathogenic hyphomycete *Lecanicillium muscarium* (Hyphomycetes: Moniliales) on various hosts.- *European Journal of Entomology*, 104: 67-72.

- Azevedo, J. L. (1998). Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Controle Biológico. Jaguariúna: EMBRAPA. v.1, p.69-96.
- Bateman R P. 1997. Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 67-79.
- Batista Filho, A.; Cardelli, M.A. (1986). Viabilidade dos esporos de *B. bassiana* (Bals.) Vuill. isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. *Biológico*, São Paulo, v. 52, p.57- 59.
- Batista Filho, A., J.E.M. Almeida & L.A. Machado. (2002). Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 8., 2002, Recife. Anais. 21: 84-89.
- Berto, P.; Comménil, P.; Belingheri, L.; Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *Fems Microbiology. Lett* 180:183-189.
- Bidochka, M. J.; St. Leger, R. J.; Roberts, D. W. (1997). Mechanisms of Deuteromycete fungal infection in grasshoppers and Locusts an overview. *Memoris of the Entomological Society of Canada*. 171:213-224.
- Bittencourt, S. E. T.; Castro, L. A.; Farias, S. E.; Bao, S. N.; Scrank, A. & Vainstein, M. H. (2004). Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricid fungus *Metarhizium anisopliae*. *Res. Microbiol.* 155:681-687.
- Bogo, M. R.; Rota, C.A.; Pinto JR. H.; Campos, M.; Corrêa, C. T.; Vainstein, M. H. & Scrank, A. (1998). A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Curr. Microbiol.* 37:221-225.
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Messias, C.L.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001a). Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v. 72, p.140-146.

- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001b). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*, Duluth, v.78, p.98-108,
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001c). Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v.74, p.734-739.
- Braga G.U.; Rangel, D. E.; Anderson, A. J.; Roberts, D.W. (2006) Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*. V.82, p. 481-422.
- Brockhoff, H.: Action of Pancreatic Lipase on Emulsions of Water-insoluble Esters, *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 366, 1969
- Cagan, L.; Svercel, M. (2001). The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Central European Agriculture*, Konosu Saitama, v.2, n.4, p. 119-125.
- Chelico, L.; Khachatourians, G.G. (2008). Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 98, p. 93-100.
- Clarkson, J.M. & Charnley, A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* 4:197-204.
- Comménil, P.; Belingher, L.; Bauw, G.; Dehorter, B. (1999). Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* of grape berry cuticle. *Physiology Mol. Plant Pathol.* V.55, p. 37-43.
- Edgington, S.; Segura, H. ; LA Rosa, W. Williams, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee Berry borer. *International Journal of Pest Management*, London, V. 46, N.3, P. 169-176.
- Fang, W.; Pei, Y.; Bidochka, M. J. (2007). A regulation of a G protein Signaling (RGS) gene *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*

- is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. 153:1017-1025.
- Faria, M.R.; Magalhães, B.P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.22, p.18-21.
- Fargues, J.; Goettel, M.S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Vidal, C.; Lacey, L.A.; Lomer, C.J.; Rougier, M. (1996) Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. *Mycopathologia*, Holanda, v.135, p.171-181.
- Gillespie JP, Bateman R and Charnley AK (1998) Role of cuticle- degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 71:128-137.
- Goettel, M.S.; Inglis, G.D.; Wraight S.P. (2000). Fungi. In:Field manual of techniques in invertebrate pathology. Cap.4. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.255-282.
- Göttlich, E.; de Hoog, G. S.; Yoshida, S.; Takeo, K.; Nishimura, K.; Miyaji, M. (1995). Cell-Surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycosis*, 38:489-494.
- Hajek, A. E. and St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-32.
- Hallsworth, J.E. & Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.* 74: 261-266.
- Hegedus, D. D., y Khachatourians, G. G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Review. Biotechnology Advances*, 13(3): 455-490.
- James, R. R.; Buckner, J. S.; Freeman, T. P. 2003. Cuticular lipids and Silverleaf Whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 84, p. 67-74.
- Jarrold, S. L.; Moore, D.; Potter, U.; Charnley, A. K. (2007). Contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research*. 111:240-249.

- Kim, J. S.; Skinner, M.; Parker, B. L. (2010). Plant oils for improving thermotolerance of *Beauveria bassiana*. *Journal Microbiology Biotechnology*. V.20, n.9, p. 1348-1350.
- Kosir, J. M., MacPherson, J. M., y Khachatourians, G. G. (.1991). Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphism. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 534-541.
- Krieger, De Moraes, C. ; Schrank, A.; Vainstein, M. H. (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46:205-210.
- Lord, J.C. & Howard, R.W. (2004). A proposed role of the cuticular fatty amides of *Lipocelis botrychophila* (Psocoptera: Lipocelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*. 158:211-217.
- Moraes, C.K.; Schrank, A. Vainstein, M.H. (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, v.46, n.3, p.205-210.
- Nahar, P.; Ghormade, V., Deshpande, M. V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: Possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal Invert. Pathol.* 85:80-88.
- Nicholson, W.L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H.J.; Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.3, p.548-572.
- Pedriani, N.; Crespo, R.; Juarez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology part: Toxicology and Pharmacology*.146:124-137.
- Rangel, D. E.; Anderson, A. J.; Roberts, D. W. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*. V.90, n.1, p. 55-8.
- Rangel, D.E.; Butler, M.J.; Torabinejad, J.; Anderson, A.J.; Braga, G.U.; Day, A.W.; Roberts, D.W. (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae*

- are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal Invertebrate Pathology*. V.93, n.3, p.170-82.
- Robert, A. & AL Aidroos, K. M. (1985). Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of *in vitro* amylase, protease and lipase activity. *J. Invert. Pathol.* 45:9-15.
- Roberts, D.W.; Flint, S.D. (2002). Tools of the UV trade light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, Londrina. Proceedings... Londrina: 2002, p.237-240.
- Screen, S. E.; Hu, G.; St. Leger, R.J. (2001). Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *Anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *Acrididum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* 78:260-266.
- Stehr, F.; Kretschmar, M.; Kröger, C.; Hubea, B.; Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 22: 347–355.
- Sitch, J.C. & Jackson, C.W. (1997) Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. *Mycology Research*, 101, 535-541.
- Silva, W. O. B.; Mitidieri, S.; Schrank, A.; Marilene Henning Vainstein, M. H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry.* 40: 321–326.
- Soza-Gomez, D. R.; Boucias, D. G.; Nation, J.I. (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology.* 69:31-39.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95.
- St. Leger, R.J.; Goettel, M.; Roberts, D.W.; Staples, R.C.; (1991). Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, p.168-179.

- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1986a). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.167-177.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986b). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.295-302.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986c). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1987a). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.253, p.221-232.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1987b). Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.258, p.123-131.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1987c). Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*. 133:1371-1382.
- St. Leger, R.J.; Durrands, P.K.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1988a). Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.52, p.285-293.
- St. Leger, R.J.; Butt, T.M.; Staples, R.C.; Roberts, D.W. (1989). Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, v.13, p.253-262.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1991b). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, p.415-426.
- St. Leger, R.J.; Frank, D.C.; Roberts, D.W.; Staples, R.C. (1992a). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural



- gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*, v.204, p.991-1001.
- St Leger, R. J.; Staples, R. C. ; Roberts, D. W. (1992b). Cloning and analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 120:119-124.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1993). Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 139:237-243.
- St. Leger, R.J. (1995). The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, v.73, n.1, p.1119-1125.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996a). Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.4, p.1257-1264.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996b). Characterization and ultrastructural localization of chitinase from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environment Microbiology*. 62:907-912.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Roberts, D.W. (1996c). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:6349-6354.
- Szafranek, B.; Maliński, E.; Nawrot, J.; Sosnowska, D.; Ruszkowska, M.; Pihlaja, K.; Trumpakaj, Z.; and Szafranek, J. (2001). In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Arkivoc*. V.3, p. 81-94.
- Tiago, PV. and Furlaneto, MC., (2003). O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, vol. 2, no. 1, p. 40-51.

- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103:6647-6652.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2007a). The *Metarhizium anisopliae* Perilipin homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, aressorial turgor pressure and virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 21110-21115.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2007b). The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insect, and the MAD2 adhesion enables attachment to plants. *Eukariotic Cell*. 6:808-816.
- Zimmermann, G. (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v.40, n.1, p.36-40.

### 3. TRABALHOS

#### MIRMECOFAUNA ASSOCIADA A CULTIVOS DE PALMA FORRAGEIRA INFESTADOS POR *Dactylopius opuntiae*

##### RESUMO

As formigas apresentam hábitos variados dentro dos ecossistemas e podem desenvolver estreita relação com comunidades de artrópodes, seja como predadores generalistas ou ainda em associação mútua com insetos pertencentes à ordem Hemiptera: Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha entre outros. Os objetivos deste trabalho foram realizar um levantamento da mirmecofauna presente nas áreas de palma forrageira infestadas por *D. opuntiae*, observando sua relação com as comunidades do inseto em estudo e verificando por fim o potencial das espécies de formigas para o controle biológico de *D. opuntiae*. As coletas de formigas nas áreas de palma forrageira infestadas com cochonilha do carmim foram realizadas utilizando armadilhas do tipo "Pit-fall" contendo solução de formol 0,04 % distribuídas nas áreas de duas formas, enterradas no solo e suspensas nas plantas avaliadas e armadilhas contendo atrativos alimentares com uma fonte lipoproteica e uma fonte glicose (sardinha e goiabada). Os levantamentos de campo revelaram a

presença de diversas espécies de formigas nas plantas infestadas, algumas com maior representatividade noturna e outras diurnas. No entanto, houve espécies com ocorrência em ambos os turnos. Quanto à abundância das espécies, foi observado que as armadilhas utilizadas proporcionaram um levantamento expressivo de espécies conforme suas preferências alimentares e conforme os ambientes amostrados. Dentre as espécies amostradas no município de Sertânia, a mais abundante foi *Crematogaster sp* (1825 exemplares), amostrada em todas as armadilhas testadas, principalmente nas armadilhas com atrativo alimentar, seguida das espécies *Brachimymex pictus* (808 exemplares), *Dorymyrmex sp.1* (660 exemplares) , *Pheidole sp.4* (617 exemplares) e *Solenopsis sp.* (595 exemplares). O município de Dormentes também apresentou abundância de espécies, sendo mais expressivas, *Dorymyrmex sp.1* (1329 exemplares), *Pheidole sp.4* (865 exemplares), *Camponotus sp.* (712 exemplares), *Solenopsis sp.* (389 exemplares), *Ectoatomma edendatum* (353 exemplares). O município de Serrita, no entanto apresentou como mais abundantes as espécies *Camponotus sp.* (542 exemplares), *Pheidole sp. 4* (356 exemplares) e *Solenopsis sp.* (188 exemplares). Embora a espécie *Crematogaster sp.* tenha sido a única observada predando *D. opuntiae*, esta pode não ser a única a apresentar este comportamento perante o inseto em estudo. Sendo assim, estudos mais detalhados sobre o padrão de predação de *D. opuntiae* pelas espécies de formigas amostradas poderiam revelar mais claramente seu potencial no controle biológico desta praga.

## ABSTRACT

Ants have varied habits within ecosystems and can develop close relationships with communities of arthropods, as generalist predators or mutual associations with insects belonging to the order Hemiptera: Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha among others. The objectives of this work was to evaluate the mirmecofauna in the areas where cactus palms are infested by *D. opuntiae*, observing its relationship with the communities of the insect and verifying the potential of the species of ants for the biological control of *D. opuntiae*. The collections of ants in the areas of cactus palm infested with scale insects were accomplished using "Pit-fall" containing a solution of formol 0.04% distributed in the tested areas in two ways, buried in the soil and suspended in the appraised plants. Traps containing alimentary attractions with a lipoprotein source and a glucose source (sardine and guava jelly) were also used. The field evaluations revealed the presence of several species of ants on or near the infested plants, some nocturnal and others diurnal. However, there were species that were active during both periods. As for the abundance of the species, it was observed that the traps provided an increasing number of species according to their alimentary preferences and in accordance to the sampled habitats. Among the sampled species in the district of Sertânia, the most abundant was *Crematogaster* sp (1825 samples), found in all of the tested traps, mainly in the traps with feeding attractants, followed by the species *Brachymyrmex pictus* (808 samples), *Dorymyrmex* sp.1 (660 samples), *Pheidole* sp.4 (617 samples) and *Solenopsis* sp. (595 samples). The municipal district of Dormentes also presented abundance of species, being more expressive, *Dorymyrmex* sp.1 (1329 samples), *Pheidole* sp.4 (865 samples), *Camponotus* sp. (712 samples), *Solenopsis* sp. (389 samples), *Ectoatomma edendatum* (353 samples). However, in Serrita, *Camponotus* sp. (542 samples), *Pheidole* sp. (356 samples) and *Solenopsis* sp. (188 samples) were the more abundant species. Although *Crematogaster* sp. was the only one observed preying on *D. opuntiae*, this is probably not the only one to present this behavior. More detailed studies on the predatory behavior of the species of ants identified here could reveal their potential as biological control of *D. opuntiae*.

## INTRODUÇÃO

As formigas têm uma relevante importância ecológica pela sua grande diversidade e distribuição, representando em torno de 40% da biomassa dos ecossistemas (Hölldobler & Wilson, 1990), no entanto constituem apenas 1,5% da fauna de insetos descrita.

Uma das razões do sucesso desses insetos sobre a terra se deve entre outros fatores, ao seu hábito alimentar diversificado e à sua capacidade de modificar ou explorar seu ambiente e nidificar nos mais diversos ecossistemas terrestres (Hölldobler & Wilson, 1990). Quanto aos hábitos alimentares alguns grupos de formigas são fungívoros (Hölldobler & Wilson, 1990), outros se alimentam de exsudatos de nectários florais e extraflorais (Almeida & Figueiredo, 2003; Delabie et al., 2003, Del Val & Dizo, 2004), “*honeydew*” de pulgões, cochonilhas e cigarrinhas (Delabie & Fernández, 2003), sementes (Gordon, 2002), além de outros grupos que são predadores, ou onívoros (Fowler et al., 1991), podendo ocupar simultaneamente vários lugares em uma cadeia trófica (Jaffe, 2004).

Segundo Fernández & Palacio (2006), conforme seus hábitos alimentares os gêneros podem ainda ser classificados em caçadoras generalistas (*Hypoponera*, *Pachycondyla*), onívoras (*Ectatomma*, *Camponotus*, *Paratrechina*), dependentes de produtos vegetais (*Azteca*, *Pseudomyrmex*, *Solenopsis*), mirmecófagas (*Simopelta*), caçadoras nômades (Ecitoninae), fungívoras (Attini), oófagas (*Proceratium*) ou “vaqueiras”, que criam “homópteros” para se alimentar de suas excreções (*Camponotus*, *Acropyga*).

### 1. Levantamentos de mirmecofauna no bioma caatinga

A região Nordeste é uma das mais carentes de estudos da biodiversidade devido à escassez de recursos humanos especialistas (taxônomos) e materiais tais como coleções, além da falta de instituições com capacidade e vontade de manter tais coleções. Ao considerar que apenas 10 % dos inventários publicados no país em um período compreendido entre 1985-1999, foram realizados na região sob o domínio das Caatingas, sendo assim os

táxons de invertebrados pertencentes a este bioma, particularmente os terrestres reúnem o maior nível de incerteza atual (Lewinsohn & Prado, 2002).

No que refere a estudos da mirmecofauna, a situação não é diferente. No entanto, o estudo e caracterização da mirmecofauna do domínio das Caatingas vêm sendo realizados desde 1990.

Apenas no estado do Ceará, os estudos mais expressivos foram realizados por Brandão (1995), em três áreas de “caatinga” *sensu stricto* dos estados do Piauí e da Bahia, e por Leal (2003), em diversas áreas de caatinga dos estados de Alagoas e Sergipe. No Ceará, os inventários de formigas foram iniciados em 2002, por um programa visando caracterizar a fauna de formigas de solo das principais matas úmidas de altitude do estado.

## **2. Associação entre formigas e hemípteros (Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha)**

Muitas espécies de formigas convivem com “homópteros” (Hemiptera: Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha) sugadores de folhas de plantas, como pulgões, cochonilhas, membracídeos e psilídeos para alimentar-se de suas excreções açucaradas. Um fenômeno similar se apresenta com larvas de Lepidópteros das famílias Lycaenidae e Riodinidae (Farb, 1988; Hölldobler & Wilson, 1990; Delabie et al., 2003; Delabie & Fernández, 2003). Neste contexto a relação estabelecida entre mirmecos e Hemiptera: Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha

Devido a uma peculiaridade do sistema digestivo dos Hemiptera: Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha, estes ingerem uma quantidade de nutrientes até dez vezes maior que sua capacidade de assimilação, sendo assim excretam todo o excesso na forma de um líquido açucarado denominado “*honeydew*”, por se tratar de um produto da digestão desses insetos apresenta-se parcialmente degradado, porém rico em glicose, sacarose e frutose altamente atrativo para alguns grupos de formigas (Fowler et al., 1991; Delabie et al., 2003). Em contrapartida as formigas oferecem proteção a seus provedores contra o ataque de alguns inimigos naturais tais como parasitóides e predadores (Delabie et al., 2003).

### 3. Formigas como agentes de controle biológico

As formigas desenvolvem várias funções dentro dos ecossistemas, dentre as quais se destaca sua atuação como predadores influenciando significativamente sobre a estrutura trófica em comunidades de artrópodes (Floren *et al.* 2002).

O gênero de formigas Neotropicais predadoras *Ectatomma* inclui 14 espécies que se distribuem do México até a Argentina, sendo que oito ocorrem na Bahia e nos Estados vizinhos. É destacada a importância desse grupo de formigas no controle biológico natural das pragas dos cultivos tropicais. Em se tratando de predadoras eficazes se destacam duas espécies do gênero *Ectatomma*, *E. muticum* que é endêmica da caatinga e das restingas ao norte de Salvador e *E. opaciventre* que ocorre perto e ao norte de Salvador, onde vive em áreas com vegetação fortemente degradada. Outra espécie de destaque é a *Pachycondyla obscuricornis* devido a potencial de exploração podendo deslocar-se por distâncias superiores a 10 m em busca de presas e nidificar a até 1 m de ninhos da mesma espécie.

Além de apresentar hábito de caça solitário, ausência de recrutamento, e deslocamento rápido pela vegetação, em estudo de predação realizado com *Pachycondyla obscuricornis*, foi verificado que sua taxa de predação apresenta sensível aumento com a abundância da presa no caso do estudo de predação de cigarrinha, chegando a representar 93,8% das presas capturadas. Segundo Sujii *et al.* (2004), *Pachycondyla obscuricornis* é predadora voraz e representa potencial agente de controle de populações da cigarrinha-das-pastagens em pastagens cultivadas.

Segundo esses autores, muitos gêneros de formigas incluem predadores especialistas, como *Cerapachys*, *Neivamyrmex*, *Proceratium*, *Strumigenys* e *Thaumatomyrmex*, por exemplo, que se alimentam de um conjunto restrito de artrópodos, embora possam se alimentar de outras espécies.

O presente estudo tem como objetivos realizar levantamentos das formigas presentes nas áreas de palma forrageira infestadas por *D. opuntiae*, observando a relação entre estes insetos e verificar o potencial das espécies de formigas para o controle biológico da cochonilha do carmim.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Levantamento de espécies de formigas presentes nas áreas de palma forrageira infestadas com *D. opuntiae*

O presente estudo foi realizado em três municípios no estado de Pernambuco que enfrentam problemas causados pela *D. opuntiae*, sendo desenvolvidos trabalhos em três locais de cultivo de palma forrageira por município. Os municípios foram: Sertânia/PE, localização S08°06'36"/W036°15'27.4", S08°04'08"/W37°14'06.6" e S08°05'40.6"/W36°15'19.1", município de Dormentes/PE, localização S08°27'27.6"/W040°45'46.0", S08°31'39.7"/W040°42'07,4" e S07°56'30.4"/W039°20'22.1" e no município de Serrita/PE, localização S07°56'30.4"/W039°20'22.1", S07°56'34.3"/W039°20'14.2" e S07°55'58.5"/W039°20'11.0". Nos municípios de Dormentes/PE e Serrita/PE a infestação de *D. opuntiae* é mais recente tendo relatos de seu início em 2008.

A coleta de formigas nas áreas de palma forrageira infestadas com cochonilha do carmim foi realizada utilizando armadilhas do tipo "Pit-fall" contendo solução de formol 0,04 % distribuídas na áreas de duas formas, enterradas no solo e suspensas nas plantas avaliadas e armadilhas contendo atrativos alimentares com uma fonte lipoproteica e uma fonte glicose (sardinha e goiabada). A armadilha do tipo Pit-fall de solo utilizada caracteriza-se por um recipiente de vidro com abertura superior em torno de 4,5 cm de diâmetro que foi enterrado de tal forma que sua abertura superior ficasse ao nível do solo. Enquanto que a armadilha tipo Pit-fall suspensa caracteriza-se por um frasco coletor de plástico com abertura superior em torno de 5 cm de diâmetro adaptado com fios de nylon para fixação nas plantas avaliadas.

Os atrativos alimentares foram dispostos ao mesmo tempo e lado a lado na área sobre pedaços de cartolina em formato retangular nas dimensões de

12cm x 8cm. A captura de formigas foi realizada com o auxílio de pinças, as amostras sendo acondicionadas em frascos contendo álcool 70%.

As áreas avaliadas tinham em torno de 1,5 há, sendo assim foram distribuídas 10 armadilhas tipo Pit-fall, enterradas aleatoriamente buscando representar a área em estudo. A distribuição das armadilhas tipo Pit-fall suspensas foram afixadas em plantas que receberam os tratamentos com fungos entomopatogênicos. Essas plantas foram escolhidas aleatoriamente segundo alguns critérios: plantas com infestação moderada, mas que apresentassem com no mínimo 10 fêmeas instaladas completamente desenvolvidas e eqüidistantes de modo que houvesse uma bordadura de plantas que a isolasse dos demais tratamentos.

Além das coletas realizadas com o auxílio das armadilhas mencionadas, foram feitas também coletas de formigas visitantes diurnas e noturnas em plantas de palma infestadas por *D. opuntiae* com o auxílio de pinças entomológicas e acondicionadas em frascos de vidro contendo álcool 70%. As armadilhas tipo Pit-fall permaneceram na área por três dias enquanto que as armadilhas contendo atrativo alimentar foram dispostas por uma hora. As formigas coletadas foram classificadas por características morfológicas em laboratório e posteriormente enviadas para identificação no Laboratório de Mirmecologia da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC)/SP.

Ensaio anteriores revelaram índices de predação elevados em alguns dos tratamentos testados. Os tratamentos empregados foram constituídos pelos isolados que apresentaram maior número de predação de cochonilhas por formigas, buscando investigar se esses isolados estariam de certa forma influenciando a predação pela presença de algum metabólito específico ou apenas pelo óleo de girassol constituinte da calda. Para verificar tais variáveis os tratamentos foram aplicados como se segue:

- 1- Água destilada
- 2- Óleo de girassol (8%)
- 3- CG24 e Triton X 100 (0,05%)
- 4- LCB61 e Triton X 100 (0,05%)
- 5- ESALQ818 e Triton X 100 (0,05%)
- 6- LCB63 e Triton X 100 (0,05%)
- 7- CG24 e óleo de girassol (8%)

- 8- LCB61 e óleo de girassol (8%)
- 9- ESALQ818 e óleo de girassol (8%)
- 10-LCB63 e óleo de girassol (8%)
- 11-CG24 autoclavado
- 12-LCB61 autoclavado
- 13-ESALQ818 autoclavado
- 14-LCB63 autoclavado
- 15-Plantas não tratadas

A avaliação dos índices de predação de fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae* por formigas foi realizada por meio de observações comportamentais das formigas mediante a aplicação ou não de alguns tratamentos sobre raquetes de palma forrageira naturalmente infestada e por contagens do número de cochonilhas presentes antes e depois dos tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os levantamentos de campo apresentados nas Tabelas 1 e 2 revelaram a presença de algumas espécies de formigas nas plantas infestadas, sendo que algumas com maior representatividade noturna e outras diurna, no entanto pôde ser observado que algumas espécies estavam presentes em ambos os turnos.

Quanto à abundância das espécies observa-se que as armadilhas utilizadas proporcionaram um levantamento expressivo de espécies conforme suas preferências alimentares e conforme os ambientes amostrados. As áreas do município de Sertânia, por exemplo, dentre as espécies amostradas a mais abundante foi *Crematogaster* sp (1825 exemplares), embora tenha sido amostrada em todas as armadilhas testadas, esteve mais presente nas armadilhas com atrativo alimentar. As espécies *Brachimyrme pictus* (808 exemplares), *Dorymyrme* sp.1 (660 exemplares), *Pheidole* sp.4 (617 exemplares) e *Solenopsis* sp. (595 exemplares), também apresentaram um número elevado de indivíduos e foram amostradas em todas as armadilhas utilizadas.

No município de Dormentes as espécies mais abundantes foram *Dorymyrme* sp.1 (1329 exemplares), *Pheidole* sp.4 (865 exemplares), *Camponotus* sp. (712 exemplares), *Solenopsis* sp. (389 exemplares), *Ectoatomma edendatum* (353 exemplares). O município de Serrita, no entanto apresentou como mais abundantes as espécies *Camponotus* sp. (542 exemplares), *Pheidole* sp. 4 (356 exemplares) e *Solenopsis* sp. (188 exemplares).

Estes resultados corroboram com os obtidos por Leal (2003), em estudos de dispersão de sementes por formigas em áreas de caatinga, onde a subfamília Myrmicinae foi mais representativa.



Os resultados apresentados na Tabela 2 referem-se a coletas manuais realizadas nas áreas de estudo, observando o comportamento dessas formigas com relação à *D. opuntiae* nos períodos noturnos e diurnos.

As espécies mais abundantes durante os três dias amostrados no período noturno no município de Sertania foram, *Crematogaster* sp., *Solenopsis* sp. e *Pheidole* sp., já no município de Dormentes as espécies mais abundantes foram *Brachimyrme pictus* seguida de *Solenopsis* sp., em Serrita, porém a maior atividade noturna foi para *Camponotus* sp.

De acordo com Cuzzo (2003), na maioria, as espécies de Dolichoderinae são onívoras, forrageando sobre a superfície do solo. O alimento consiste, principalmente, de insetos mortos, cera e exsudatos de plantas. Este fato comportamental pode explicar o fato da espécie *Dorymyrmex* sp.1 ter sido mais abundante nas armadilhas de solo conforme demonstrado na Tabela 1. Além disso, segundo Cuzzo, (2003) as espécies de *Dorymyrmex* constroem seus ninhos no solo, em regiões áridas ou semi-áridas, preferindo lugares abertos, com pouca cobertura vegetal, onde são dominantes do ponto de vista ecológico.

De acordo com Fernández (2003), as mirmicíneas apresentam uma diversidade de hábitos muito grande, proporcional à riqueza de espécies dentro da subfamília. Há espécies arborícolas, como *Cephalotes*, *Procryptocerus*, *Crematogaster*, *Daceton*, e *Allomerus*; habitantes do solo e da serrapilheira, como *Basicerotini*, *Strumigenys*, *Pyramica* e *Leptothorax*, *Myrmicini*, *Ochetomyrmecini*, *Pheidologetonini*, *Pheidole*, *Solenopsidini*, *Stegomyrmecini*, *Stenammini*, *Adelomyrmex* e *Tatuidris*. Algumas apresentam associações com plantas (*Allomerus* e *Crematogaster*), com fungos (Attini) e com outras formigas (*Crematogaster*) (Fernández, 2003). Estes relatos reforçam e explicam a abundância de mirmicíneas nas diferentes armadilhas utilizadas.

Tabela 2. Frequência de formigas visitantes diurnas e noturnas em plantas de palma forrageira infestadas por *D. opuntiae*

Espécie/ Morfoespécie	Atividade (%)					
	Sertania		Dormentes		Serrita	
	Noturna	Diurna	Noturna	Diurna	Noturna	Diurna
<i>Crematogaster sp.</i>	30.83	16.67	0	0	0	0
<i>Pheidole sp.</i>	16.67	0	25	0	0	6.38
<i>Pseudomyrmex pallidus</i>	0.83	0	0	0	0	0
<i>Solenopsis sp.</i>	23.33	16.67	20.31	0	1.6	31.91
<i>Brachymyrmex pictus</i>	6.67	20.83	6.25	0	2.1	13.8
<i>Tapinoma melanocephalum</i>	0.83	0	0	0	0	0
<i>Camponotus sp.11</i>	2.50	0	0	0	0	0
<i>Camponotus novogranadensis (Myrmaphaenus)</i>	4.17	8.33	7.81	0	0	1.06
<i>Pheidole sp.4</i>	9.17	0	0	0	0	0
<i>Ectatomma edendatum</i>	2.50	0	12.5	0	0	0
<i>Gnamptogenys striatula</i>	2.50	25	0	0	0	0
<i>Paratrechina longicornis</i>	0	4.17	0	0	0	0
<i>Dorimyrmex sp1</i>	0	8.33	7.81	0	0	0
<i>Camponotus sp.</i>	0	0	7.81	0	7.4	4.2
<i>Cyphomyrmex transversus</i>	0	0	1.56	0	0	0
<i>Camponotus (Taemyrmex)</i>	0	0	4.68	0	0	0

Durante as observações noturnas nas áreas do município de Sertania foi verificada a predação por formigas em várias plantas. A espécie observada em intensa predação de *D. opuntiae* foi a *Crematogaster* sp. Embora esta tenha sido a única espécie observada predando esta praga não se pode afirmar que esta seja a única. Poneríneas predadoras por excelência, porém se aproveitam também de fontes ricas em carboidratos, como nectários ou exsudatos de hemípteros Auchenorrhinchos. (Hölldobler & Wilson, 1990; Lattke, 2003c).

A visitação freqüente de formigas às plantas infestadas pode estar ligada ao fato de que a vegetação dessas áreas é rica em fontes de alimentos renováveis. Nestes ambientes, as formigas podem atuar como predadoras e acarretar um forte efeito sobre a comunidade de insetos herbívoros. Como predadoras generalistas, as formigas podem ser consideradas os principais fatores de pressão seletiva sobre insetos herbívoros. Conseqüentemente, elas podem afetar o padrão de utilização de plantas hospedeiras pelos herbívoros, incluindo o grau de especialização, bem como as estratégias de defesa contra predadores (Dyer 1995, Stamp 2001, Singer & Stireman 2003, Coley *et al.* 2006).

Outros autores relatam predação de pragas importantes por formigas, Fernandes *et al.* (1994) verificaram que na região sudeste do Brasil, formigas *Pheidole* spp são capazes de reduzir a população de bicudos-do-algodoeiro em diapausa ao interceptar os adultos tenarais, imediatamente após sua emergência dos botões. Ramalho *et al.* (1993), ressaltam que as condições climáticas da região do semi-árido brasileiro, a rápida dessecação dos botões florais do algodoeiro caídos no solo, parecem facilitar a localização dos imaturos de *Anthonomus grandis* o bicudo-do-algodoeiro pelas formigas.

Em observações de campo foi constatado que em alguns casos a predação não se efetivava por completo, apenas a camada de ceras das cochonilhas eram retiradas por completo, fato este suficiente para levar as cochonilhas à morte, uma vez que sem esta proteção *D. opuntiae* se torna vulnerável às condições climáticas das regiões onde se encontra. Este fator pode estar ligado à presença de óleo de girassol na composição da calda aplicada, uma vez que as formigas necessitam de fontes lipídicas para compor sua dieta. Conforme relatado em alguns estudos, as formigas apresentam



caráter predatório generalista (Monteiro, 2008), sendo assim buscam as mais diversas fontes de nutrientes.

Os resultados demonstrados no Quadro 1, mostram uma regularidade de predação de *D. opuntiae* por formigas entre as áreas testadas. No entanto, não há regularidade entre os tratamentos aplicados nas referidas áreas, a predação pode estar ligada à presença de óleo de girassol presente na maioria dos tratamentos onde houve predação expressiva, como é o caso do tratamento contendo apenas óleo de girassol (tratamento controle), o qual apresentou predação acima de 50% em duas das áreas testadas (Dormentes e Serrita). Demonstrando que as formigas presentes ali apresentam potencial para atuar como agentes de controle biológico para esta praga. Conforme sugerido por Delabie & Mariano (2000), é recomendado manter e manejar as comunidades de formigas de ocorrência natural devido ao potencial na regulação de pragas.



Quadro 1. Média de predação de Fêmeas adultas de *D. opuntiae* em raquetes de palma forrageira.

Tratamentos	Sertania			Dormentes			Serrita		
	Médias (%) ± DP			Médias (%) ± DP			Médias (%) ± DP		
Óleo de girassol	6.41b	±	4.3	55.45a	±	38.7	52.88a	±	12.9
Água	0.00	±	0.0	46.29a	±	30.7	5.73b	±	2.2
CG24+ Triton x100	50.4a	±	38.8	61.70a	±	34.0	31.22ab	±	14.0
LCB61+ Triton x100	0.00	±	0.0	52.99a	±	40.8	0.00c	±	0.0
ESALQ 818+ Triton x100	0.00	±	0.0	57.22a	±	38.0	50.78a	±	30.0
LCB63+ Triton x100	0.00	±	0.0	53.20a	±	44.8	19.80ab	±	9.5
CG24+ óleo de girassol	0.00	±	0.0	59.98a	±	35.3	10.37b	±	0.4
LCB61+óleo de girassol	21.30ab	±	9.6	57.80a	±	39.6	12.18bc	±	1.6
ESALQ818 + óleo de girassol	9.87b	±	17.1	56.40a	±	37.8	32.14a	±	11.5
LCB63 + óleo de girassol	0.00	±	0.0	7.13b	±	4.0	1.45c	±	0.4
CG24 autoclavado	0.00	±	0.0	16.58b	±	8.6	26.15ab	±	2.9
LCB61 autoclavado	40.20a	±	42.5	39.55ab	±	52.6	43.76a	±	18.2
ESALQ818 autoclavado	0.00	±	0.0	58.40a	±	36.3	12.82bc	±	8.2
LCB63 autoclavado	0.00	±	0.0	59.91a	±	34.8	28.18ab	±	5.3

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05).

## CONCLUSÕES

1. As áreas estudadas apresentavam abundância de espécies onívoras e predadoras por excelência como é o caso das Ponerínae e Myrmicenaes;
2. Apesar de haver regularidade entre as áreas quanto à abundância de espécies de formigas, não houve regularidade entre os índices de predação relacionados aos tratamentos, apresentando padrões diferenciados de predação para o mesmo tratamento entre as repetições (áreas/ município);
3. Apesar das variações entre a população amostrada nas áreas de estudo, todas apresentaram predação de *D. opuntiae* por formigas;
4. Apesar da espécie *Crematogaster sp.* ter sido a única observada predando *D. opuntiae*, esta pode não ser a única a apresentar este comportamento perante o inseto em estudo;
5. Estudos mais detalhados sobre o padrão de predação de *D. opuntiae* pelas espécies de formigas amostradas poderiam revelar mais claramente seu potencial no controle biológico desta praga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameida, A. M.; Figueiredo, R. A. 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos-SP, v. 63, n. 4, p. 551-558.
- Brandão, C.R.F. Formigas dos cerrados e caatingas. 1995. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 147f.1995.
- Cuezo, F. 2003. Subfamilia Dolichoderinae. In: Fernández, F. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 291-297.
- Delabie, J.H.C.; Agosti, D. & Nascimento, I.C. 2000. Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain forest region. In: Agosti, D.; Majer, J.D.; Alonso, L. & Schultz, T. (Eds.), *Sampling ground-dwelling ants: case studies from the world's rain forests*. Bulletin 18. Curtin University School of Environmental Biology, Perth, Australia, p.117.
- Delabie, J. H. C. & Fernández, F. 2003. Relaciones entre hormigas y "homópteros" (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: Fernández, F. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 181-197.
- Del Val, E.; Dizo, R. 2004. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. *Interciencia*, Caracas, v. 29, n. 12, p. 673-679, dec. Floren, A.; A. Biun & Linsenmair. 2002. Arboreal ants as key predators in tropical lowland forest trees. *Oecologia* 131: 137-144
- Fernández, F.; Palacio, E. E. 2003. Sistemática y filogenia de las hormigas: breve repaso a propuestas. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 29-44.
- Fowler, H. G.; L. C. Forti; C. R. F. Brandão; J. H. C. Delabie & H. L. Vasconcelos. 1991. Ecología nutricional de formigas. p: 131-223. In: A. R.

- Panizzi, & J. R. P. Parra. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo, Editora Manole Ltda. 359 p.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990: The ants. – The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA, 732 pp.
- Jaffe, K. 2004. El mundo de las hormigas. 2ª. Edición. Caracas: Equinoccio/ediciones de la Universidad Simón Bolívar, 148p.
- Lattke, J. E. Subfamília Ponerinae. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). Introducción a las hormigas de la región Neotropical. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003c. p. 261-276.
- Leal, I. R. 2003. Diversidade de formigas em diferentes unidades de paisagem da Caatinga. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M. & DA SILVA, J. M. C. (orgs.). Ecologia e conservação da Caatinga. Editora Universitária, Recife. p. 435-461.
- Lewinsohn, T.M. & Prado, P.I. 2002. (Eds.). Biodiversidade Brasileira: síntese de estado atual do conhecimento. São Paulo: Editora Contexto.
- Monteiro, A.F.M. Togni, P. H. Sujii, E. R. 2008. Biologia de *Labidus coecus* em agroecossistema de tomateiro orgânico no Distrito Federal. CD ROM dos resumos do XXCongresso Brasileiro de Zoologia.
- Sujii, E. R. Garcia, A. G., Fontes, E. M. G. and O'Neil, R. J. 2004. *Pachycondyla obscuricornis* as natural enemy of the spittlebug *Deois flavopicta*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.39, n.6, p.607-609

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Os resultados revelam a possibilidade do uso de fungos entomopatogênicos no controle de *D. opuntiae*, e adição de óleo vegetal às formulações parece favorecer a adesão à camada de cera das fêmeas adultas. Quando expostos à radiação solar e UV, os isolados de fungos entomopatogênicos testados apresentaram maior susceptibilidade à radiação solar. Entretanto, os isolados apresentaram uma recuperação nos índices de germinação com o aumento de tempo de incubação indicando uma relativa capacidade de reparar os possíveis danos causados pela radiação seja de fonte natural (solar) ou artificial.

Os isolados mais promissores quanto à tolerância à radiação solar foram LCB55 e LCB62, apresentando respectivamente 83,9% e 15,4% de germinação às 48 h de incubação. Quanto à tolerância a temperaturas os isolados com melhor desempenho foram LCB61 e LCB62, apresentando respectivamente 88,28% e 35,15% de germinação aos 30 °C. O isolado LCB61 mostra-se superior ao LCB62 quanto à tolerância à temperatura, pois aos 35 °C apresentam respectivamente 85,24% e 0,0%.

Ao analisar a atividade enzimática dos isolados testados mostraram que os níveis mais elevados de atividade de tripsina foram associados com isolado LCB53, o qual demonstrou 5 proteases com uma ampla gama de massas moleculares em geis de atividade SDS-PAGE. Os isolados LPP19 e LCB55 expressaram duas principais proteases de elevada massa molecular, embora com menor atividade global que LCB53. Quanto aos isolados LCB52 e LCB62 apenas demonstraram atividade traço "em gel".

A atividade de lipase foi detectada apenas em filtrados da cultura de LCB62 e LCB55 quando utilizado azeite como substrato. Analisando todos os fatores estudados e associando - os ao potencial dos isolados como agentes de biocontrole de *D. opuntiae* pode-se inferir que os isolados LCB62 e LCB55 podem apresentar melhor desempenho em relação aos fatores limitantes em condições de campo tais como potencial de recuperação dos danos causados pela radiação solar. Quanto à tolerância a temperaturas elevadas, mesmo que

insipiente considerando ainda o aparato enzimático dos isolados LCB62 e LCB55 também demonstram desempenho considerável.

Os levantamentos mirmecofaunísticos revelam abundância de espécies de formigas onívoras e predadoras por excelência como é o caso das Ponerinae e Myrmicinae. Apesar de haver regularidade entre as áreas quanto à abundância de espécies de formigas, não houve regularidade entre os índices de predação relacionados aos tratamentos, apresentando padrões diferenciados de predação para o mesmo tratamento entre as repetições (áreas/ município). Embora haja variações entre a população amostrada nas áreas de estudo, todas apresentaram predação de *D. opuntiae* por formigas.

A espécie *Crematogaster* sp. foi a única observada predando *D. opuntiae*, porém esta pode não ser a única espécie a apresentar este comportamento perante o inseto em estudo. Para obter mais evidências, porém são necessários estudos mais detalhados sobre o padrão de predação de *D. opuntiae* pelas espécies de formigas amostradas para que hajam evidências que revelem mais claramente o potencial de cada espécie no controle biológico de *D. opuntiae*.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J. E. M. & A. Batista Filho (2001). Banco de microrganismos entomopatogênicos. Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenvolvimento. 20: 30-33.
- Alves, S.B. (1986c ). Patologia geral. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole, p.3-70.
- Alves, B.S. & Lopes, R. B. (2008). Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ. V. 14.p.69-104.
- Alves, S.B. (1982). Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorok. 95p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Alves, S.B. (1986a). Epizootiologia. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole,. p.29-60.
- Alves, S.B. (1986b). Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole,. p.73-126.
- Alves, S.B.; Silveira Neto, S.; Pereira, R.M.; Macedo, N. (1987). Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. *Ecossistema*, Espírito Santo do Pinhal, v.12, p.78-87.
- Ameida, A. M.; Figueiredo, R. A. 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a brazilian rainforest: effects on herbivory and polinization. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos-SP, v. 63, n. 4, p. 551-558.
- Arruda, W.; Lübeck, I.; Scrank, A.; Vainstein, M.H. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Acarology*. 37:231-244.
- Askary H., Yarmand H., (2007). Development of the entomopathogenic hyphomycete *Lecanicillium muscarium* (Hyphomycetes: Moniliales) on various hosts.- *European Journal of Entomology*, 104: 67-72.A1:A82
- Askary, H., Benhamou, N., & Brodeur, J. (1999). Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74, 1-13.
- Bateman R P. 1997. Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 67-79.
- Batista Filho, A., J.E.M. Almeida & L.A. Machado. (2002). Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 8., 2002, Recife. Anais. 21: 84-89.

- Batista Filho, A.; Cardelli, M.A. (1986). Viabilidade dos esporos de *B. bassiana* (Bals.)Vuill. isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. *Biológico*, São Paulo, v. 52, p.57- 59.
- Berto, P.; Comménil, P.; Belingheri, L.; Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *Fems Microbiology. Lett* 180:183-189.
- Bidochka, M. J.; St. Leger, R. J.; Roberts, D. W. (1997). Mechanisms of Deuteromycete fungal infection in grasshoppers and Locusts an overview. *Memoris of the Entomological Society of Canada*. 171:213-224.
- Bittencourt, S. E. T.; Castro, L. A.; Farias, S. E.; Bao, S. N.; Scrank, A. & Vainstein, M. H. (2004). Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricid fungus *Metarhizium anisopliae*. *Res. Microbiol.* 155:681-687.
- Bogo, M. R.; Rota, C.A.; Pinto JR. H.; Campos, M.; Corrêa, C. T.; Vainstein, M. H. & Scrank, A. (1998). A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Curr. Microbiol.* 37:221-225.
- Braga G.U.; Rangel, D. E.; Anderson, A. J.; Roberts, D.W. (2006) Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*. V.82, p. 481-422.
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Messias, C.L.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001a). Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v. 72, p.140-146.
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001b). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*, Duluth, v.78, p.98-108,
- Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. (2001c). Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v.74, p.734-739.
- Brandão, C.R.F. Formigas dos cerrados e caatingas. 1995. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 147f.1995.
- Clarkson, J.M. & Charnley, A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*4:197-204.
- Cuezo, F. 2003. Subfamilia Dolichoderinae. In: Fernández, F. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 291-297.

- Del Val, E.; Dizo, R. 2004. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. *Interciencia*, Caracas, v. 29, n. 12, p. 673-679, dec. Floren, A.; A. Biun & Linsenmair. 2002. Arboreal ants as key predators in tropical lowland forest trees. *Oecologia* 131: 137-144
- Delabie, J. H. C. & Fernández, F. 2003. Relaciones entre hormigas y "homópteros" (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: Fernández, F. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 181-197.
- Delabie, J.H.C.; Agosti, D. & Nascimento, I.C. 2000. Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain forest region. In: Agosti, D.; Majer, J.D.; Alonso, L. & Schultz, T. (Eds.), *Sampling ground-dwelling ants: case studies from the world's rain forests*. Bulletin 18. Curtin University School of Environmental Biology, Perth, Australia, p.117.
- extracelular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.52, p.285-293.
- Fang, W.; Pei, Y.; Bidochka, M. J. (2007). A regulation of a G protein Signaling (RGS) gene *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. 153:1017-1025.
- Faria, M.R.; Magalhães, B.P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.22, p.18-21.
- Fernández, F.; Palacio, E. E. 2003. Sistemática y filogenia de las hormigas: breve repaso a propuestas. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 29-44.
- Fowler, H. G.; L. C. Forti; C. R. F. Brandão; J. H. C. Delabie & H. L. Vasconcelos. 1991. Ecología nutricional de formigas. p: 131-223. In: A. R. Panizzi, & J. R. P. Parra. *Ecología nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo, Editora Manole Ltda. 359 p.
- Gillespie JP, Bateman R and Charnley AK (1998) Role of cuticle- degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 71:128-137.
- Hajek, A. E. and St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-32.
- Hallsworth, J.E. & Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.* 74: 261-266.
- Hegedus, D. D., y Khachatourians, G. G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Review. Biotechnology Advances*, 13(3): 455-490.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990: *The ants*. – The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA, 732 pp.

- James, R. R.; Buckner, J. S.; Freeman, T. P. 2003. Cuticular lipids and Silverleaf Whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrat Pathology*. V. 84, p. 67-74.
- Jarrold , S. L.; Moore, D.; Potter, U.; Charnley, A. K. (2007). Contribution of surface waxes to pre-penetration gruth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Reseach*. 111:240-249.
- Kim, J. S.; Skinner, M.; Parker, B. L. (2010). Plant oils for improving thermotolerance of *Beauveria bassiana*. *Journal Microbiology Biotechnology*. V.20, n.9, p. 1348-1350.
- Kosir, J. M., MacPherson, J. M., y Khachatourians, G. G. (.1991). Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphism. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 534-541.
- Krieger, De Moraes, C. ; Schrank, A.; Vainstein, M. H. (2003). Rgulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol*. 46:205-210.
- Lord, J.C. & Howard, R.W. (2004). A proposed role of the cuticular fatty amides of *Lipocelis botrychophila* (Psocoptera: Lipocelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*. 158:211-217.
- Monteiro, A.F.M. Togni, P. H. Sujii, E. R. 2008. *Biologia de Labidus coecus em agroecossistema de tomateiro orgânico no Distrito Federal*. CD ROM dos resumos do XXCongresso Brasileiro de Zoologia.
- Moraes, C.K.; Schrank, A. Vainstein, M.H. (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, v.46, n.3, p.205-210.
- Nahar, P.; Ghormade, V., Deshpande, M. V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: Possible edge to entomopathogenic fungi in the biological controlo f insect pests. *Journal Invert. Pathol*. 85:80-88.
- Nicholson, W.L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H.J.; Setlow, P. (2000). Resistence of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.3, p.548-572.
- Pedrini, N.; Crespo, R.; Juarez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology part: Toxicology and Pharmacology*.146:124-137.
- Rangel, D. E.; Anderson, A. J.; Roberts, D. W. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*. V.90, n.1, p. 55-8.

- Rangel, D.E.; Butler, M.J.; Torabinejad, J.; Anderson, A.J.; Braga, G.U.; Day, A.W.; Roberts, D.W. (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal Invertebrate Pathology*. V.93, n.3, p.170-82.
- Robert, A. & AL Aidroos, K. M. (1985). Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of *in vitro* amylase, protease and lipase activity. *J. Invert. Pathol.* 45:9-15.
- Roberts, D.W.; Flint, S.D. (2002). Tools of the UV trade light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, Londrina. Proceedings... Londrina: 2002, p.237-240.
- Silva, W. O. B.; Mitidieri, S.; Schrank, A.; Marilene Henning Vainstein, M. H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40: 321–326.
- Sitch, J.C. & Jackson, C.W. (1997) Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. *Mycology Research*, 101, 535-541.
- Soza-Gomez, D. R.; Boucias, D. G.; Nation, J.I. (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69:31-39.
- St Leger, R. J.; Staples, R. C.; Roberts, D. W. (1992b). Cloning and analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 120:119-124.
- St. Leger, R.J. (1995). The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, v.73, n.1, p.1119-1125.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1991b). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, p.415-426.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1993). Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 139:237-243.
- St. Leger, R.J.; Butt, T.M.; Staples, R.C.; Roberts, D.W. (1989). Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, v.13, p.253-262.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986b). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.295-302.

- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1986c). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1987a). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.253, p.221-232.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1986a). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.167-177.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1987b). Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.258, p.123-131.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. (1987c). Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*. 133:1371-1382.
- St. Leger, R.J.; Durrands, P.K.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. (1988a). Role of
- St. Leger, R.J.; Frank, D.C.; Roberts, D.W.; Staples, R.C. (1992a). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*, v.204, p.991-1001.
- St. Leger, R.J.; Goettel, M.; Roberts, D.W.; Staples, R.C.; (1991). Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.58, p.168-179.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996a). Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.4, p.1257-1264.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. (1996b). Characterization and ultrastructural localization of chitinase from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environment Microbiology*. 62:907-912.
- St. Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Roberts, D.W. (1996c). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:6349-6354.
- Stehr, F.; Kretschmar, M.; Kröger, C. ; Hubea, B.; Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22: 347–355.

- Szafranek, B.; Maliński, E.; Nawrot, J.; Sosnowska, D.; Ruszkowska, M.; Pihlaja, K.; Trumpakaj, Z.; and Szafranek, J. (2001). In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Arkivoc*. V.3, p. 81-94.
- Tiago, PV. and Furlaneto, MC., (2003). O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, vol. 2, no. 1, p. 40-51.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103:6647-6652.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2007a). The *Metarhizium anisopliae* Perilipin homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, aressorial turgor pressure and virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 21110-21115.
- Wang, C.; St. Leger, R. J. (2007b). The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insect, and the MAD2 adhesion enables attachment to plants. *Eukariotic Cell*. 6:808-816.
- Zimmermann, G. (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v.40, n.1, p.36-40.