

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOINSETICIDA DE LINHAGENS DE *Isaria farinosa* E DOS EXTRATOS NATURAIS DE *Caesalpinia ferrea* SOBRE *Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) PRAGA DA PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia ficus-indica*) EM PERNAMBUCO

RECIFE/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ROSINEIDE DA SILVA LOPES

AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOINSETICIDA DE LINHAGENS DE *Isaria farinosa* E DOS EXTRATOS NATURAIS DE *Caesalpinia ferrea* SOBRE *Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) PRAGA DA PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia ficus-indica*) EM PERNAMBUCO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima

Colaboradores: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Dr. Antonio Félix da Costa

RECIFE/2013

Elaine Barroso
CRB 1728

Lopes, Rosineide da Silva

Avaliação do efeito bioinseticida de linhagens de *Isaria farinosa* e dos extratos naturais de *Caesalpinia ferrea* sobre *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) praga da forrageira (*Opuntia ficus-indica*) em Pernambuco/ Rosineide da Silva Lopes – Recife: O Autor, 2013.

274 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadora: Elza Áurea de Luna Alves Lima e Antonio Félix da Costa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Pragas - controle biológico 2. Inseticidas 3. Cacto I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orientadora) II. Costa, Antonio Félix da (coorientador) III. Título**

628.97

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-77

Avaliação do efeito bioinseticida de linhagens de *Isaria farinosa* e dos extratos naturais de *Caesalpinia ferrea* sobre *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) praga da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) em Pernambuco

ROSINEIDE DA SILVA LOPES

Recebeu menção **APROVADA**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima – Depto. de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima – Deptº de Micologia – UFPE

Profa. Dra. Auristela Correia de Albuquerque- Depto. de Biologia – UFRPE

Dr. Antonio Félix da Costa – Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Depto. de Bioquímica – UFPE

Recife, 31 de julho de 2013.

“E a PAZ de DEUS, que excede todo o entedimento, guardará os vossos corações e os vossos sentimentos em CRISTO JESUS”.

Filipenses 3.7

Ao meu Esposo

José Robson Portela Lopes

Pelo carinho, amor e paciência.

OFEREÇO

Ao meus pais

Terezinha M^a Rosa da Silva e Severino Raimundo da Silva.

*Pelo grande amor, dedicação e apoio constante,
minha eterna e sincera gratidão.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu infinito amor, bondade e misericórdia;

Em especial, aos meus pais (Severino Raimundo da Silva e Terezinha Maria Rosa da Silva) pelo amor, força e carinho e, acima de tudo, pela educação cristã e pela oportunidade de ser uma pessoa digna e responsável. Agradeço a Deus por ter me concedido o privilégio de tê-los como pais;

Ao meu esposo José Robson Portela Lopes, pelo amor, paciência e compreensão, que tanto me ajudaram, não apenas durante a conclusão deste trabalho de Tese, mas ao longo do meu curso de Mestrado;

Aos meus irmãos Ronaldo e Maria Aparecida, pela amizade concedida. Também aos meus sobrinhos Danyelle, Rafaela, Raiane, Daniel, Raissa e Rafael por me fazerem sorrir nos momentos mais difíceis;

À minha orientadora, Professora Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima por ter aceitado me orientar, meu eterno agradecimento. Nunca esquecerei os conhecimentos valiosos e, acima de tudo, a paciência, amizade e apoio constantes que me ajudaram a concluir mais uma etapa da minha vida;

À minha coorientadora, Professora Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima pelo grande incentivo, valiosos ensinamentos e exemplo de profissionalismo, os quais contribuíram para minha formação acadêmica. Além disso, agradeço todo o carinho, amizade e compreensão concedidos durante os anos que passei sob sua orientação, os quais me ajudaram a realizar esta pesquisa;

Ao Dr. Antonio Félix da Costa, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e de ter acreditado que eu seria capaz, com responsabilidade e comprometimento, de realizar um bom trabalho. Também pelo exemplo de profissional e de perseverança no qual me espelhei no momento de maiores dificuldades. Agradeço a Deus a valiosa oportunidade de tê-lo conhecido;

À amiga Dra. Luciana Gonçalves de Oliveira, pelo companheirismo, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados. Obrigada por sua amizade;

A Tatiana Maria de Albuquerque, pelo incentivo, ajuda e, em especial, pela amizade desde o

tempo de infância;

À amiga Dra. Mônica Martins, pela ajuda e disponibilidade nos experimentos com nossos queridos cupins. Obrigada querida;

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), colaboradores constantes: Luciana, Ana Carla, Geize, Agatha, Dandara, Samuel, Pátricia e Rose, pelos bons momentos e pela boa convivência;

A todos os meus amigos de sala, pela harmoniosa convivência durante o decorrer do curso;

A todos os professores do Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que contribuíram para minha formação acadêmica;

Ao pesquisador Venésio Felipe dos Santos, do IPA, pela realização das análises estatísticas e pelas orientações;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste (BNB), pelo apoio na realização dos trabalhos dessa Tese;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, concedendo a bolsa de Doutorado;

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco e ao Departamento de Bioquímica/UFPE pelas facilidades para a realização de todos os experimentos deste trabalho;

Aos funcionários do Instituto Agronômico de Pernambuco e do Departamento de Bioquímica/UFPE, em especial Ana Patrícia, Samuel e João pela ajuda e disponibilidade. Obrigada;

A todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A utilização de inseticidas químicos no controle de insetos-praga causa danos ao meio ambiente devido à contaminação do solo, água (lençóis freáticos, rios e lagoas), fauna, flora e o próprio homem. Assim, o uso de fungos entomopatogênicos e extratos vegetais são considerados métodos eficientes e seguros, com baixo impacto ambiental. A cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) parasita os cladódios da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) causando perdas na produção do vegetal. *Nasutitermes corniger* é uma espécie de cupim arborícola considerada praga nas áreas urbanas, causando muitos prejuízos econômicos. Em função disso, o trabalho teve por objetivo avaliar a ação de três espécies de *Isaria*, dos extratos de folhas e vagens de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (= *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*) e da folha de *Agave sisalana* sobre *D. opuntiae* e *N. corniger*; o efeito dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin sobre a *D. opuntiae*, bem como a ação sinérgica dos extratos e dos inseticidas sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios dos fungos. Neste estudo foram realizados bioensaios usando suspensões de 1×10^8 conídios/mL de linhagens de *Isaria farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea*. Foram testados extratos aquoso e metanólico de folhas (EAFLf e EMFLf) e vagens (EAVLf, e EMVLf) de *L. ferrea* var. *ferrea* e extratos aquoso e hidroetílico de *A. sisalana* (EAAs e EHEAs), nas concentrações de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL, bem como os inseticidas nas concentrações mínima, média e máxima recomendadas pelos fabricantes dos produtos. Os resultados demonstraram que os fungos não foram patogênicos sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, mas afetaram significativamente *N. corniger* tendo sido observado que a linhagem *I. farinosa* ESALQ1355 foi a mais eficiente, causando a morte de 95% dos operários (CL_{50} $6,66 \times 10^4$ conídios/mL) e 85% dos soldados (CL_{50} $6,81 \times 10^4$ conídios/mL) após o 4º dia da aplicação dos tratamentos. Atividade inseticida sobre ambas as espécies de insetos foi obtida com extratos vegetais. Para *D. opuntiae* o EAFLf foi mais eficiente sobre as fêmeas adultas causando a morte de 97% (CL_{50} 4,60 mg/mL), enquanto o EMVLf promoveu a mortalidade de 82% das ninfas. Adicionalmente, para *N. corniger* o EAFLf foi o que apresentou maior atividade termicida, causando a morte de 100% dos operários (CL_{50} 6,10 mg/mL) e dos soldados (CL_{50} 14,10 mg/mL) após três dias do tratamento. Todos os inseticidas comerciais testados foram eficientes sobre a cochonilha-do-carmim. Os resultados com o Clorpirifós demonstraram ser esse inseticida o mais efetivo, por induzir a morte de 90% dos insetos na concentração mínima. Além do mais, foi observado que os extratos e os inseticidas Acetamiprid e Thiamethoxan foram compatíveis com os fungos, por não haver inibido o crescimento, esporulação e germinação das linhagens fúngicas. A associação entre os extratos e as três linhagens mais eficientes demonstrou que *I. farinosa* ESALQ1355 foi a mais efetiva no controle dos operários. Por outro lado, a associação dos extratos com todos os inseticidas demonstrou eficiência sobre ninfas e fêmeas adultas da cochonilha, sendo o maior percentual de mortalidade (90%) obtido pela associação de extratos com o inseticida Clorpirifós. Os resultados demonstram o potencial dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e de *A. sisalana* no controle de *D. opuntiae* e *N. corniger*, bem como das três espécies de *Isaria*, em especial de *I. farinosa* ESALQ1355, no controle do cupim. Portanto, esses agentes entomopatogênicos representam uma alternativa viável para o controle e o manejo integrado de *D. opuntiae* e *N. corniger* em plantações de palma e em áreas urbanas, respectivamente, no Nordeste brasileiro.

Palavras-chave: controle biológico, palma forrageira, extratos vegetais, fungos entomopatogênicos, inseticidas, *Dactylopius*, *Nasutitermes*.

ABSTRACT

The use of chemical insecticides in the control of insect pests cause damage to the environment due to the contamination of soil, water (groundwater, streams and ponds), fauna, flora and man. Thus, the use of entomopathogenic fungi and plant extracts are efficient and safe methods with low environmental impact. Cochineal carmine (*Dactylopius opuntiae*) parasite the forage palm cladodes (*Opuntia ficus-indica*) causing losses in vegetable production. *Nasutitermes corniger* is an arboreal termite specie considered prague in many urban. As a result, the study aimed to evaluate the action of three species of *Isaria*, extracts of leaves and pods of *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (= *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*) and leaves of *Agave sisalana* against *D. opuntiae* and *N. corniger*, as well as the effect of Chlorpyrifos, Acetamiprid, Thiamethoxan and Lambacyhalothrin insecticides on the *D. opuntiae*, and the synergistic action of extracts and insecticides on the mycelial growth, sporulation and germination of conidia of fungi. The bioassay carried out using a suspension of spore (1×10^8 conidia/mL) of *Isaria farinosa*, *I. javanica* and *I. fumosorosea* strains. Water and Meoh extracts were tested (EAFLf and EMFLf) and pods (EAVLf and EMVLf) of *L. ferrea* var. *ferrea*, and aqueous extracts and hydroethylic of *A. sisalana* (EAAs and EHEAs), at concentrations of 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL and 200 mg/mL, as well as insecticides in the minimum, average and maximum concentrations recommended by the manufacturers. The results showed that the fungi were not pathogenic for *D. opuntiae* nymphs and adult females, but significantly affected *N. corniger* having been observed that the strain *I. farinosa* ESALQ1355 was the most efficient, causing the death of 95% of workers (LC_{50} 6.66×10^4 conidia/mL) and 85% of the soldiers (LC_{50} 6.81×10^4 conidia/mL) after the 4th day of the application of treatments. The insecticidal activity of both insects' species was obtained with plant extracts. For *D. opuntiae*, the EAFLf was more efficient on the adult females causing the death of 97% (LC_{50} 4.60 mg/mL), while the EMVLf promoted the 82% mortality of nymphs. In addition, to *N. corniger*, the EAFLf was the one that showed the highest termicita activity, causing the death of 100% of workers (LC_{50} of 6.10 mg/mL) and soldiers (LC_{50} 14.10 mg/mL) after three days of treatment. All commercial insecticides tested were efficient a cochineal carmine's. However, the Chlorpyrifos insecticide was the most effective, to induce the death of 90% of insects in minimum concentration. Moreover, it was observed that the extracts and the Acetamiprid and Thiamethoxan insecticides were compatible with the fungi, because they not inhibited its growth, sporulation and germination. The association between the extracts and the three most efficient strains showed that *I. farinosa* ESALQ1355 was the most effective in the control of workers. On the other hand, the association between of extracts and insecticides demonstrated efficiency on cochineal nymphs and adult females, being the highest percentage of mortality (90%) obtained by the association of extracts with the Chlorpyrifos insecticide. The results demonstrate the potential of *L. ferrea* var. *ferrea* and *A. sisalana* extracts against *D. opuntiae* and *N. corniger*, as well as three species of *Isaria*, in particular *I. farinosa* ESALQ1355, on the termite control. Therefore, these entomopathogenic agents represent a viable alternative for the control and the integrated management of *D. opuntiae* and *N. corniger* in palm plantations and urban areas, respectively, in the northeast of Brazil.

Key words: biological control, forage Palm, plant extracts, entomopathogenic fungi, insecticide, *Dactylopius*, *Nasutitermes*.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Páginas
Figura 1. Plantação de <i>Opuntia ficus-indica</i> localizada na Estação Experimental do IPA, em Caruaru, Pernambuco. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	23
Figura 2. <i>Opuntia ficus-indica</i> : flor (a) e frutos (b). Fonte: www.inforjardim.com.....	23
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Dactylopius opuntiae</i> : fêmea (a), ovo, ninfa I (b), ninfa II (c) e macho (d). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	27
Figura 4. Cupinzeiros de <i>Nasutitermes corniger</i> em árvores da UFPE. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	31
Figura 5. <i>Nasutitermes corniger</i> : operário (a) e soldado (b). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	32
Figura 6. Aspecto do verso e reverso da colônia das linhagens <i>Isaria farinosa</i> ESALQ1205 (a; b), <i>I. farinosa</i> ESALQ1355 (c; d), <i>I. farinosa</i> URM5016 (e; f) e <i>I. farinosa</i> URM5060 (g; h) após 12 dias de crescimento em SAB a 26 °C. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	49
Figura 7. Microestruturas das linhagens de <i>Isaria farinosa</i> após 96 horas de cultivo em SAB. Conidióforo simples e conídios catenulados (a), conidióforos verticilados (b) e apressórios simples (c) de <i>Isaria farinosa</i> ESALQ1205; conidióforos verticilados e conídios (d) e apressórios simples (e) de <i>I. farinosa</i> ESALQ1355; conidióforos verticilados e conídios catenulados (f) de <i>I. farinosa</i> URM5016, conidióforos e conídios catenulados (g) e apressório simples (h) de <i>I. farinosa</i> URM5060. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).	50
Figura 8. Operários de <i>Coptotermes gestroi</i> colonizados por <i>Isaria javanica</i> URM4995 (a) e <i>Isaria javanica</i> URM4993 (b). Fonte: Lopes et al. (2011).....	54
Figura 9. Aspecto do verso e do reverso da colônia das linhagens <i>Isaria javanica</i> URM4993 (a; b) e <i>I. javanica</i> URM4995 (c; d). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).	54
Figura 10. Microestruturas das linhagens de <i>Isaria javanica</i> após 96 horas de cultivo em SAB. Conidióforos verticilados e conídios catenulados (a) e apressórios simples e bifurcados (b) de <i>Isaria javanica</i> URM4993; conidióforos verticilados e conídios (c) e apressórios bifurcados (d) de <i>Isaria javanica</i> URM4995. Fonte: próprio autor. Lopes	

(2013).....	55
Figura 11. Aspecto do verso e do reverso da colônia das linhagens <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1296 (a; b) e <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297 (c, d). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	57
Figura 12. Microestruturas das linhagens de <i>Isaria fumosorosea</i> após 96 horas de cultivo em SAB. Conidióforos em ramos verticilados (a) e apressório bifurcado (b) de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1296; conidióforos em ramos verticilados (c) e apressórios simples e bifurcado (d) de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	61
Figura 13. Espécime de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> . Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	69
Figura 14. Plantação de <i>Agave sisalana</i> localizada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA)-Recife. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).....	72
 ARTIGO 1	
Fig. 1. Operário de <i>Nasutitermes corniger</i> colonizado por <i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355...	140
 ARTIGO 2	
Figura 1. Mortalidade de ninfas e fêmeas adultas de <i>Dactylopius opuntiae</i> tratadas com extratos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (mg/mL). EAVLf (a); EAFLf (b), EMVLf (c); EMFLf (d). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	160
Figura 2. Mortalidade de ninfas e fêmeas adultas de <i>Dactylopius opuntiae</i> tratadas com extratos de <i>Agave sisalana</i> (mg/mL). EAAs (a); EHAS (b). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	161
Figura 3. Efeito da associação de inseticidas com os extratos aquosos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> sobre ninfas e fêmeas adultas de <i>Dactylopius opuntiae</i> : EMFLf (a ; b) e EMVLf (c ; d). Tratamentos: Controle, CL ₅₀ dos Extratos, CL ₅₀ dos inseticidas e CL ₅₀ das associações (A1-extrato+Clorpirifós, A2-extrato+Thiamethoxan, A3-extrato+Acetamiprid e A4-extrato+Lambacyhalothin). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	162

Figura 4. Efeito da associação de inseticidas com os extratos metanólicos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre ninfas e fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae*: EMFLf (a ; b) e EMVLf (c ; d). Tratamentos: Controle, CL₅₀ dos Extratos, CL₅₀ dos inseticidas e CL₅₀ das associações (A1-extrato+Clorpirifós, A2-extrato+Thiamethoxan, A3-extrato+Acetamiprid e A4-extrato+Lambacyhalothin). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05)..... 163

Figura 5. Efeito da associação de inseticidas com o extrato aquoso (a) e hidroetílico (b) de *Agave sisalana* sobre fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae*. Tratamentos: Controle, CL₅₀ dos Extratos, CL₅₀ dos inseticidas e CL₅₀ das associações (A1-extrato+Clorpirifós, A2-extrato+Thiamethoxan, A3-extrato+Acetamiprid e A4-extrato+Lambacyhalothin). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)..... 164

Figura 6. Efeito do extrato aquoso da folha de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre fêmea adulta e ninfas de *Dactylopius opuntiae*..... 165

ARTIGO 3

Fig. 1. Percentual de sobrevivência de operários e soldados *Nasutitermes corniger* tratados com os extratos aquosos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: EAFLf sobre operários (a) e soldados (b). EAVLf sobre operários (c) e soldados (d), nas concentrações 10 (⊖), 25(⊕), 50 (⊖), 100 (⊕), 200 mg/L (⊖) e o controle (*). Cada ponto é apresentado como média ± SE das cinco repetições. 197

Fig. 2. Percentual de sobrevivência de operários e soldados *Nasutitermes corniger* tratados com os extratos metanólico de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: EMFLf sobre operários (a) e soldados (b). EMVLf sobre operários (c) e soldados (d), nas concentrações 10 (⊖), 25(⊕), 50 (⊖), 100 (⊕), 200 mg/L (⊖) e o controle (*). Cada ponto é apresentado como média ± SE das cinco repetições..... 198

Fig. 3. Efeito da associação das linhagens fúngicas com os extratos de folha (aquoso e metanólico) de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre os operários de *Nasutitermes corniger*: *Isaria farinosa* ESALQ1355 (a), *Isaria javanica* URM4993 (b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297 (c). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 199

Fig. 4. Efeito da associação das linhagens fúngicas com os extratos de vagem (aquoso e metanólico) de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre os operários de *Nasutitermes corniger*: *Isaria farinosa* ESALQ1355 (a), *Isaria javanica* URM4993 (b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297. Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (c) 200

ARTIGO 4

Figura 1. Percentual de sobrevivência de operários e soldados *Nasutitermes corniger* tratados com os extratos aquoso e hidroetílico de *Agave sisalana*: EAAs sobre operários (a) e soldados (b). EHEAs sobre operários (c) e soldados (d), nas concentrações 10 (⊕), 25 (△), 50 (▽), 100 (◇), 200 mg/L (⊖) e o controle (⊖). Cada ponto é apresentado como média ± SE das cinco repetições..... 226

Figura 2. Efeito da associação das linhagens fúngicas com os extratos aquoso e hidroetílico de *Agave sisalana* sobre os operários de *Nasutitermes corniger*: *Isaria farinosa* ESALQ1355 (a), *Isaria javanica* URM4993 (b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297 (c). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 227

LISTA DE TABELAS

Páginas

ARTIGO 1

Tabela 1. Inseticidas utilizados nos experimentos e registrados para o controle de cochonilhas da ordem Hemiptera.....	134
Tabela 2. Linhagens de <i>Isaria</i> utilizadas nos experimentos e percentual de germinação dos conídios.....	135
Tabela 3. Mortalidade confirmada de <i>Nasutitermes corniger</i> por linhagens de <i>Isaria</i> aos quatro dias de infecção.....	136
Tabela 4. Concentração Letal (CL ₅₀) das linhagens de <i>Isaria</i> sobre <i>Nasutitermes corniger</i>	137
Tabela 5. Percentual de mortalidade de ninfas de <i>Dactylopius opuntiae</i> tratadas com as linhagens de <i>Isaria</i>	138
Tabela 6. Efeito dos inseticidas sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10 ⁷ conídios/mL) das espécies de <i>Isaria</i>	139

ARTIGO 2

Tabela 1. Inseticidas utilizados nos experimentos e registrados para o controle de cochonilhas da ordem Hemiptera.....	166
.	
Tabela 2. Percentual de mortalidade de ninfas e fêmeas adultas de <i>Dactylopius opuntiae</i> tratadas com os inseticidas, em diferentes concentrações.....	167
Tabela 3. Concentração Letal (CL ₅₀) dos inseticidas químicos e extratos vegetais sobre	

<i>Dactylopius opuntiae</i>	168
-----------------------------------	-----

ARTIGO 3

Tabela 1. Linhagens de <i>Isaria</i> utilizadas nos experimentos.....	193
Tabela 2. Concentração Letal (CL ₅₀) dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> sobre <i>Nasutitermes corniger</i>	194
Tabela 3. Efeito dos extratos aquosos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10 ⁷ conídios/mL) das espécies de <i>Isaria</i>	195
Tabela 4. Efeito dos extratos metanólicos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10 ⁷ conídios/mL) das espécies de <i>Isaria</i>	196

ARTIGO 4

Tabela 1. Linhagens de <i>Isaria</i> utilizadas nos experimentos.....	223
Tabela 2. Concentração Letal (CL ₅₀) dos extratos de <i>Agave sisalana</i> sobre <i>Nasutitermes corniger</i>	224
Tabela 3. Efeito dos extratos de <i>Agave sisalana</i> sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10 ⁷ conídios/mL) das espécies de <i>Isaria</i>	225

LISTA DE ABREVIACÕES

EAVLf - Extrato aquoso de vagem de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*.

EMVLf - Extrato metanólico de vagem de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*.

EAFLf - Extrato aquoso de folha de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*.

EMFLf - Extrato metanólico de folha de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*.

EAAs - Extrato aquoso de *Agave sisalana*.

EHAS - Extrato hidroetílico de *Agave sisalana*.

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIações

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 <i>Opuntia ficus-indica</i>	22
3.2 Dactylopiidae e <i>Dactylopius opuntiae</i>	25
3.3 Cupins: aspectos taxonômicos e distribuição no mundo.....	29
3.4 <i>Nasutitermes corniger</i>	33
3.5 Controle biológico de insetos-praga.....	36
3.5.1 Controle biológico de cochonilhas por fungos entomopatogênicos	38
3.5.2 Controle biológico de cupins por fungos entomopatogênicos.....	40
3.5.3 <i>Isaria</i> : classificação atual e aspectos biológicos.....	46
3.5.3.1 Espécies de <i>Isaria</i> : características e importância no controle biológico.....	47
3.5.4 Uso de extratos vegetais no controle de insetos.....	62
3.5.5 Controle biológico de cochonilhas por extratos vegetais.....	64
3.5.6 Controle de <i>Dactylopius opuntiae</i> por extratos vegetais.....	65
3.5.7 Controle de <i>Nasutitermes corniger</i> por substâncias vegetais.....	65
3.6 <i>Libidibia ferrea</i> (= <i>Caesalpinia ferrea</i>).....	67
3.7 <i>Agave sisalana</i>	70
3.8 Compatibilidade de inseticidas químicos e extratos vegetais sobre os fungos entomopatogênicos	74
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
5.1 CAPÍTULO II: ARTIGO 1.....	108
Potencial bioinseticida de <i>Isaria</i> spp. no controle biológico de <i>Nasutitermes corniger</i> e <i>Dactylopius opuntiae</i> .	

5.2 CAPÍTULO III: ARTIGO 2.....	141
Efeito dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> e <i>Agave sisalana</i> no controle de <i>Dactylopius opuntiae</i> praga da palma forrageira	
5.3 CAPÍTULO IV: ARTIGO 3.....	169
Ação dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> e da associação destes com fungos do gênero <i>Isaria</i> no controle de <i>Nasutitermes corniger</i> .	
5.4 CAPÍTULO V: ARTIGO 4.....	201
Efeito termiticida dos extratos de <i>Agave sisalana</i> e da associação destes com linhagens de <i>Isaria</i> no controle de <i>Nasutitermes corniger</i> .	
6. CONCLUSÃO.....	228
7. ANEXO	229
7.1 Guia para os Autores.....	229

1. INTRODUÇÃO

A palma forrageira, *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. é uma cactácea exótica de origem mexicana, encontrada em todos os continentes, utilizada para diversas finalidades, dentre as quais a produção de medicamentos e cosméticos, a alimentação humana e como forragem animal, por ser uma valiosa fonte de água e nutrientes para os animais do semiárido do Nordeste do Brasil (HOFFMANN, 1995; SANTOS et al., 2006).

A cochonilha-do-carmim, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) é usada em alguns países para a produção do corante carmim, na indústria alimentícia e no controle biológico de cactáceas invasoras (VOLCHANSKY et al., 1999). No entanto, esse inseto vem ameaçando as cultivares de palma no semiárido do Brasil, causando perdas de até 100% na produção de forragem (SANTOS et al., 2006; CHIACCHIO, 2008).

Nasutitermes corniger (Motschulsky) é considerado o principal cupim-praga da região Nordeste, em especial das áreas urbanas do Estado de Pernambuco, sendo também encontrado nas Américas desde o Sul do México até o Norte da Argentina, causando danos em casas, edifícios e árvores (FONTES e MILANO, 2002; COSTA-LEONARDO et al., 2007; CONSTANTINO, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2012).

O uso abusivo de inseticidas químicos no controle de insetos-praga ocasiona a contaminação do meio ambiente e dos animais e, a busca por alternativas para o controle dos mesmos é alvo de constantes pesquisas, sendo o uso de fungos entomopatogênicos e de extratos vegetais um método eficiente e seguro que vem se consolidando no Brasil e em outros países (MOINO JÚNIOR, 2000; LOVATTO et al., 2004).

Os fungos entomopatogênicos são considerados bons controladores de insetos e a eficácia de espécies de *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* é comprovada contra espécies de cochonilhas como *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) e *Orthezia praelonga* Douglas (ANDALÓ et al., 2004; GARCIA e ALVES, 2005) e de cupins como *Heterotermes tenuis* (Hagen), *Coptotermes formosanus* Shiraki, *Coptotermes gestroi* (Wasmann), *Nasutitermes exitiosus* (Hill) e *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (MILNER, 2003; WANG e POWELL, 2003; ALBUQUERQUE et al., 2005, LOPES et al., 2011).

Isaria Persoon está entre os gêneros de fungos entomopatogênicos mais usados em programas de controle biológico, sendo empregado em escala comercial na Europa e nas Américas do Norte e Latina no controle de insetos (FARIA e MAGALHÃES, 2001; ALVES et al., 2008). A patogenicidade de *I. farinosa* (Holm: Fries) Fries é comprovada contra *C. gestroi* e a cochonilha do citros *Planococcus citri* (Risso) (LOPES et al., 2008; DEMIRCI et al., 2011a). *Isaria fumosorosea*

(Wize) Brown & Smith tem sido isolado de uma variedade de insetos e sua eficiência é comprovada no controle do cupm *C. formosanus* (OSBORNE, 1990; MEIKLE et al., 2005). Linhagens de *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones foram patenteadas para o controle dos cupins *C. formosanus* e *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (WRIGHT et al., 2003).

Extratos vegetais são testados contra insetos e os resultados têm se mostrado promissores (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005), pois apresentam compostos com ação inseticida contra insetos-praga (OLIVEIRA et al., 2007; SÁ et al., 2009). Nesse contexto, a possibilidade de se utilizar no Manejo Integrado de Pragas (MIP) a associação de fungos entomopatogênicos com inseticidas químicos ou extratos vegetais é viável e pode ampliar a ação desses no controle de pragas, além de reduzir os danos causados ao meio ambiente (ALVES, 1998; DAL-BELLO et al., 2001).

Caesalpinia ferrea var. *ferrea* Martius, atualmente reclassificada como *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz, é uma árvore distribuída na região tropical do Brasil, sendo usada na indústria de fármacos e na construção civil (LORENZI, 2002; QUEIROZ, 2010). Seus componentes apresentam propriedades antiinflamatórias, analgésicas, anticancerígenas e antibacterianas (CARVALHO et al., 1996; NAKAMURA et al., 2002; FREITAS et al., 2012). *Agave sisalana* Perrine ex Engelm é uma planta herbácea encontrada em muitos países tropicais, como a Tanzânia e o Brasil (CHAND et al., 1998), sendo este último o principal produtor das fibras obtidas do beneficiamento das folhas do vegetal, que são usadas para a confecção de cordas, fios e tapetes (SILVA e BELTRÃO, 1999; BANDEIRA e SILVA, 2006). O extrato de *A. sisalana* tem ação inseticida sobre *Aedes aegypti* (L.), *Culex quinquefasciatus* Say e do ácaro *Tetranychus urticae* (Koch) (PIZARRO et al., 1999; BARRETO et al., 2010).

Assim, esse estudo teve como objetivos: investigar o potencial bioinseticida de *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* e dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* no controle dos insetos *D. opuntiae* e *N. corniger*; e analisar o efeito dos extratos vegetais e dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothin sobre os aspectos biológicos de *Isaria* spp, tais como crescimento, esporulação e germinação dos conídios.

Devido aos prejuízos econômicos causados por *D. opuntiae* e *N. corniger* é de suma importância o estudo de inseticidas naturais em seu controle, visando minimizar os danos causados por essas pragas, além de reduzir os efeitos dos inseticidas químicos sobre o ambiente. Isso justifica a necessidade de investigar agentes entomopatogênicos, a fim de substituir os métodos tradicionais de controle. Também fornece informações imprescindíveis relacionadas ao controle biológico e ao Manejo Integrado de *D. opuntiae* e *N. corniger*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial bioinseticida de *Isaria* spp. e dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* sobre *D. opuntiae* e *N. corniger*, visando empregá-los como bioinseticidas no controle destes insetos

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a ação das linhagens de *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*;

- Avaliar a ação das linhagens de *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* sobre operários e soldados de *N. corniger*.

- Testar o efeito dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamthoxam e Lambacyhalothin e dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* sobre a germinação, o crescimento vegetativo e a esporulação de linhagens de *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* e selecionar os mais compatíveis;

- Avaliar o efeito dos inseticidas sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*;

- Avaliar o efeito bioinseticida dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*;

- Analisar a eficiência da associação dos extratos e dos inseticidas sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*;

- Testar o efeito bioinseticida dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* sobre operários e soldados de *N. corniger*;

- Avaliar a eficiência da associação das linhagens de *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* com os extratos vegetais sobre *N. corniger*.

3. CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Opuntia ficus-indica*

A palma forrageira, *O. ficus-indica*, pertence à Divisão Embryophyta, Subdivisão Angiospermea, Classe Dicotyledoneae, Subclasse Archiclamideae, Ordem Opuntiales, Família Cactacea. Esta é constituída por 178 gêneros, com cerca de 2.000 espécies conhecidas. As cactáceas constituem exemplo de adaptação, aproveitamento de energia e água em ambientes secos. Mundialmente são descritas 300 espécies de cactáceas do gênero *Opuntia*, as quais são encontradas do Canadá a Argentina, sendo que esse gênero e o gênero *Nopalea* reúnem as espécies de palma mais utilizadas como fonte de alimento (forragem). O nome *Opuntia* tem origem no nome de uma atinga vila grega, chamada de Opus ou Opuntia, onde o Sr. Tournefort encontrou uma planta espinhosa que o fez lembrar as cactáceas americanas (SHEINVAR, 2001; SILVA et al., 2006). As espécies dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* são originárias do continente Americano e o México é o centro de origem dessas espécies (FLORES-FLORES e TEKELENBURG, 2001). A palma *O. ficus-indica* é cultivada mundialmente para diferentes fins e o México é o maior produtor e consumidor, principalmente dos cladódios em saladas (VANEGAS-RICO et al., 2010).

Opuntiae ficus-indica é uma espécie arborecente com 3-5 m de altura, coroa larga, glabra, caule com 60-150 cm de largura, sendo os cladódios verde escuros, cobertos com uma camada de cera, medindo de 30-60 cm de comprimento, 20-40 cm de largura e 19-28 mm de espessura (Figura 1). A espécie apresenta flores de cor variando de laranja a amarela. Produz fruto doce, suculento e comestível, com 5-10 cm de comprimento e 4-8 cm de largura, de forma piriforme, ligeiramente curvado para o umbigo, amarelo, laranja, vermelha ou púrpura com muita polpa e uma casca fina e sementes obovaladas (Figura 2) (SHEINVAR, 2001).

As palmas forrageiras foram introduzidas no Brasil no final do século XIX e cultivadas especialmente no Nordeste, com o objetivo de hospedar a cochonilha-do-carmim (*Dactylopius*), produtora do corante natural carmim, a partir da síntese do ácido carmínico (PESSOA, 1967). Tem sido reportado que essas cactáceas foram trazidas pelos portugueses, por ordem de D. João VI, provavelmente das Ilhas Canárias, onde a produção do corante já era realizada (DOMÍNGUEZ, 1963). Com o insucesso do projeto, a palma passou a ser cultivada como planta ornamental, contudo, por suas características nutricionais e morfofisiológicas de adaptação às condições do semiárido é cultivada em larga escala pelos criadores das bacias leiteiras do Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2006; DUBEUX JÚNIOR et al., 2010).



Figura 1. Plantação de *Opuntia ficus-indica* localizada na Estação Experimental do IPA, em Caruaru, Pernambuco. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).



Figura 2. *Opuntia ficus-indica*: flor (a) e frutos (b).

Fonte: www.inforjardin.com

As palmas são cultivadas em mais de 500 mil hectares no Nordeste, principalmente em Alagoas e Pernambuco, sendo cultivados cerca de 150 mil hectares apenas neste Estado. A produtividade das palmas é de 5 a 30 toneladas por hectares de matéria seca, em colheita bianual, sendo esse sucesso dependente da forma de manejo, adubação e espaçamento (SANTOS et al., 2006). As palmas mais cultivadas são *O. ficus-indica* e *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, as

quais têm contribuído para a alimentação do rebanho leiteiro nos períodos de seca, pois são consideradas um excelente alimento de teor energético, além do seu conteúdo de água ($\pm 90\%$) e de nutrientes (NOBEL, 2001; SANTOS et al., 2006). Ainda, *O. ficus-indica* se destaca por sua adaptação fisiológica à escassez de água e sua característica mais notável é o ótimo potencial para produzir grandes quantidades de forragens verdes, suculentas, mesmo sob condições desfavoráveis (NOBEL, 2001).

A palma *O. ficus-indica* é rica em carboidratos solúveis, cálcio e vitamina A e apresenta baixo teor de proteína bruta e fibras (LE HOUÉROU, 1992; LIMA et al., 2003). Além disso, a palma apresenta ótima palatabilidade e alto teor de mucilagem e umidade, o que a torna uma fonte de água potável para os animais (NEFZAOUI e BEN SALEM, 2001; BEN SALEM et al., 2002). Contudo, a palma não deve ser oferecida como a única fonte de alimento, por seu baixo teor de fibras, sendo necessária a complementação com pastos secos, silagens de milho ou sorgo, feno, palhas de restos de culturas, bagaço de cana, farelo de soja, visando o enriquecimento protéico para evitar a ocorrência de diarreia nos animais (CAVALCANTI et al., 2001).

A palma forrageira é utilizada na alimentação humana e animal (como ótima fonte de energia), na medicina, na indústria de cosméticos, na proteção e conservação do solo, além de ser usada na fabricação de adesivos, colas, fibras para artesanato, papel, corantes, mucilagem e ornamentação (BARBERA, 2001). São utilizados como alimento os cladódios e os frutos da palma, sendo que os cladódios são consumidos no México como constituintes de saladas e os frutos são consumidos frescos ou secos, em compotas (MEDINA et al., 2007).

Vilela et al. (2010) avaliaram o efeito da palma na alimentação e sua forma de processamento e no comportamento de ingestão de vacas Holstein lactantes. A palma foi oferecida aos animais nas formas de cacto picado de faca (KC) e de forragem processada em máquinas (FM) e como estratégias alimentares: separado concentrado (SC) e ração total misturada (TMR). Foram registradas as variáveis comportamentais dos animais em intervalos de 10 minutos, em 48 horas consecutivas. Os resultados indicam o uso da palma processada em máquina de forragens, a fim de maximizar a ingestão e evitar alterações na composição do leite. A estratégia de alimentação TMR é recomendável para reduzir a seletividade por parte das vacas, o que resulta em um equilíbrio entre a dieta oferecida e a consumida.

O fruto de *O. ficus-indica* é atraente para produção de alimentos nutricionais, estando em crescimento a procura do mercado por esse fruto e seus derivados, o que tem levado pesquisadores a desenvolver técnicas para aumentar o tempo de armazenamento do produto. Além disso, a possibilidade de obtenção de corantes naturais dos frutos que possam ser usados em bebidas e produtos lácteos representa outra interessante perspectiva econômica (CASSANO et al., 2009).

O uso da mucilagem de *O. ficus-indica* foi investigado como um revestimento comestível

para aumentar a viabilidade de morangos. Foram testados diferentes métodos para obter o melhor material de revestimento, sendo o seu efeito testado sobre a cor, qualidade e textura da fruta. Os resultados indicaram que o revestimento de mucilagem aumenta o tempo e conservação dos morangos (DEL-VALLE et al., 2005).

O óleo das sementes de *O. ficus-indica* é rico em ácidos graxos insaturados. O teor nutritivo e o seu efeito sobre a dieta de ratos foram avaliados, sendo o consumo alimentar e o peso corporal destes roedores medidos durante nove semanas. A pesquisa sugere o teor nutricional do óleo da palma como fonte natural de óleo comestível (ENNOURI et al., 2006). Ainda Al-Juhaimi e Özcan (2013) avaliaram a composição mineral das sementes de *O. ficus-indica* coletadas em diferentes locais e verificaram que todas continham níveis elevados de cálcio, potássio, manganês e fósforo, sendo boas fontes de macro e micronutrientes e podem ser consumidas como fonte nutricional.

3.2 Dactylopiidae e *Dactylopius opuntiae*

A família Dactylopiidae pertence à ordem Hemiptera e reúne espécies de insetos fitófagos, conhecidos como grana-do-carmim ou cochonilha-do-carmim, que produzem um corante de cor vermelha, cujo princípio ativo é o ácido carmínico (DIODATO et al., 2004; GUZMÁN, 2007). Essa família é composta por nove espécies: *Dactylopius ceylonicus* (Green), *D. coccus* Costa, *D. confusus* (Cockerell), *D. opuntiae*, *D. tomentosus* (Lamarck), *D. austrinus* De Lotto, *D. confertus* De Lotto, *D. salmians* De Lotto e *D. zimmermanni* De Lotto (DE LOTTO, 1974).

Todas as espécies dessa família são originárias da América e parasitam diferentes espécies de cactáceas dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*. Todavia, algumas espécies estão se expandindo para diferentes lugares como as Ilhas Canárias, Austrália, Sul da África, Botswana, Nepal, Índia e Sirilanka (DIODATO et al., 2004). No México, as espécies de *Dactylopius* são menos ofensivas às plantações (VANEGAS-RICO et al., 2010). Algumas espécies são utilizadas na produção do corante natural para alimentos e outras, no controle de cactáceas invasoras, pois o inseto se alimenta da seiva da planta, injetando simultaneamente toxinas que causam a desidratação e morte dos cladódios, em um processo que pode durar de 15 dias a seis meses (VOLCHANSKI et al., 1999; WARUMBY et al., 2005).

O corante carmim é originado do ácido carmínico, produzido pelas fêmeas das espécies de *Dactylopius*, o qual é extraído após a trituração e dessecação destas. O corante é usado na indústria mundial de alimentos, tendo representado 90% das exportações das Ilhas Canárias no século XIX. Contudo, o uso de corantes sintéticos diminuiu consideravelmente a produção do corante carmim desde a década de 1980, no entanto, com o aumento da procura por corantes naturais nos últimos anos, a produção do corante carmim volta a interessar a economia mundial (MEDINA et al., 2007).

Dactylopius opuntiae é um inseto que parasita as espécies de cactáceas (*Opuntia* e *Nopalea*), sendo a *O. ficus-indica* seu hospedeiro preferido, na qual parasita os cladódios, produzindo pequenos tufo brancos, imóveis, constituídos por uma secreção cerosa, pulverulenta, que contém finos filamentos produzidos pelo inseto, cuja função é proteger a fêmea dos seus predadores (FLORES-FLORES e TEKELENBURG, 2001; ADAGRI-CE, 2008; CHAVEZ-MORENO et al. , 2009).

Dactylopius opuntiae apresenta metamorfose incompleta para as fêmeas, com os seguintes estágios: ovo, ninfa I, ninfa II e fêmea. Nos machos, a metamorfose é completa, pois há formação de um casulo após o estágio ninfa II, formando a pré-pupa, o qual se transforma em pupa e, depois, em um macho alado (Figura 3). Todos os estágios se alimentam dos cladódios, causando danos severos à planta, inclusive a morte (FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2006). Os ovos são de cor vermelha intensa, medindo 0,72x0,33 mm. A ninfa I é migrante, de forma ovóide e de cor vermelha. Cresce de tamanho e secreta uma cera branca que recobre o corpo, formando assim, a ninfa II que é fixa (estabelecida) de forma ovóide e de cor vermelho escura. Essas originam a fêmea ovalada, marrom-avermelhada, que mede 2,82x18,87mm, sendo seu corpo recoberto por uma cera algodonosa. Após a fecundação, a fêmea aumenta rapidamente de tamanho até 6,24x4,71 mm. Na fase de oviposição, as fêmeas expulsam os ovos, os quais permanecem embaixo do seu corpo. O macho emerge da pupa e forma filamentos cerosos compridos a partir da seção interna do abdômen. O macho adulto é de aparência frágil, de coloração avermelhada, com comprimento de 2,20 a 4,80 mm e largura de 1,30 a 1,50 mm, não dispondo de peças bucais. O inseto vive em média de três a quatro dias e fecunda várias fêmeas antes de morrer (FAO, 2001; FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2006).

Os insetos *Cactoblastis cactorum* (Bergroth) e *D. opuntiae* parasitam a palma *Opuntia stricta* (Haworth) na África do Sul, desde a introdução destes em 1930 para o controle biológico de espécies de *Opuntia*. Esses insetos são utilizados no controle de *O. stricta* na Austrália e na África, a qual é considerada uma cactácea invasora nas regiões, sendo que esse controle tem sido reforçado pelo manejo integrado pelo o uso de herbicida, em conjunto com os insetos, bem como a introdução de diferentes biótipos de *D. opuntiae* (HOFFMANN et al., 1999).

Espécies nativas de cochonilha como *D. ceylonicus*, *D. indicus* Green e *D. subterraneus* Hempel foram identificadas no Brasil, inicialmente pelo naturalista francês Luis Jacques Brunet, que assinalou a presença desses insetos em abundância no estado de Pernambuco, a partir dos municípios de Gravatá e Caruaru, contudo não produziam o carmim com a mesma qualidade da cochonilha mexicana, *D. coccus* (COSTA, 1958).

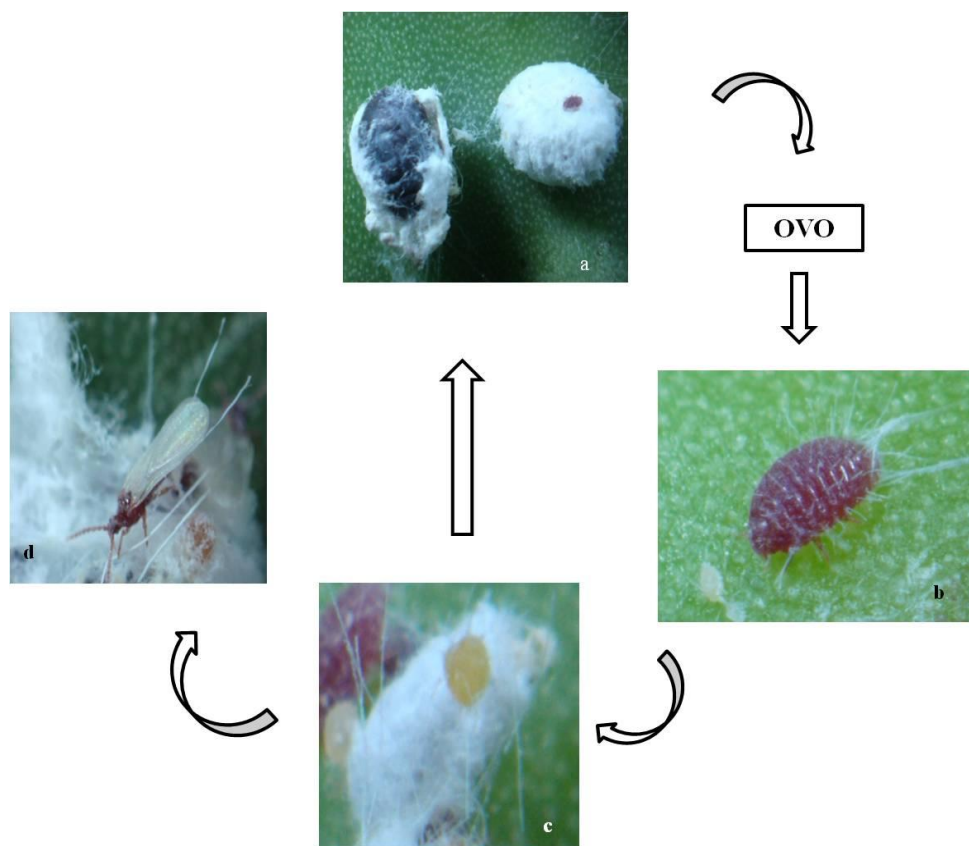


Figura 3. Ciclo biológico de *Dactylopius opuntiae*: fêmea (a), ovo, ninfa I (b), ninfa II (c) e macho (d). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

A cochonilha causa prejuízos à produção da palma devido ao processo de alimentação e injeção de substâncias tóxicas, que afeta o crescimento da planta, inviabiliza os frutos para a comercialização e ocasiona a morte do vegetal, pois causa deficiência de água e nutrientes (ZIMMERMAN e MORAN, 1991; VIGUERAS et al., 2009). Espécies de *Dactylopius* causam clorose nos cladódios e frutas das palmas que enfraquece a planta, favorecendo a infecção por patógenos de solo e causa a morte prematura do vegetal. Em geral, a cochonilha se desenvolve nas mesmas condições de suas hospedeiras e prefere temperaturas entre 24 e 28°C durante o dia, sendo este um fator importante na duração do ciclo biológico do inseto (FAO, 2001).

No Nordeste brasileiro as cultivares de *O. ficus-indica* são ameaçadas por *D. opuntiae*. Devido a sua agressividade, essa cochonilha é responsável por danos econômicos causados aos agricultores e pecuaristas, especialmente de Pernambuco, Paraíba e Alagoas, podendo alcançar 100% de perdas na produção em áreas afetadas, onde predominam as plantações das variedades

Gigante, Redonda e o clone IPA 20, as quais são suscetíveis a esse inseto-praga (SANTOS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2006; CHIACCHIO, 2008; VASCONCELOS et al., 2009). A morte de cerca 100 mil hectares de palma após a infestação do vegetal por *D. opuntiae* foi estimada em 2009, o que comprometeu a alimentação animal, causando prejuízos no desenvolvimento dos rebanhos (RIBEIRO, 2009).

O controle desse inseto pode ser feito por via mecânica (poda), química (inseticidas), controle biológico (predadores e parasitóides) e pelo uso de variedades de palma resistentes (CAVALCANTI et al., 2001). O uso de inseticidas químicos no controle da cochonilha não é recomendável, apesar de testados com eficiência pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pois pode ocasionar contaminação do meio ambiente (solo, lençol freático, rios e lagoas) e dos animais, comprometendo os produtos alimentícios consumidos pelo homem, além de não haver registro de inseticidas químicos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle dessa praga.

Há poucas alternativas para o combate de *D. opuntiae*, como o controle físico, que consiste na retirada do inseto em baixa infestação por meio da escovação dos cladódios (PALACIOS-MENDOZA et al., 2004). Produtos biodegradáveis como o detergente doméstico e o produto Peak Plus foram testados contra ninfas I, ninfas II e fêmeas adultas de *D. opuntiae* em laboratório. As ninfas I foram sensíveis ao detergente na concentração 5%, o qual causou a morte de 50%, enquanto as ninfas II e as fêmeas adultas foram mais sensíveis ao produto Peak Plus, pois matou 50% dos insetos nas concentrações de 1,5% e 3%, respectivamente (PALACIOS-MENDOZA et al., 2004).

Brito et al. (2008) analisaram o comportamento de produtos alternativos (água sanitária, querosene, óleo diesel, sabão em pó, detergente neutro, óleo mineral e óleo vegetal) no controle da cochonilha-do-carmim e compararam estes produtos aos inseticidas químicos Parathiom Metílico e Dimethoato recomendados no combate ao inseto-praga. Também testaram os produtos sobre as larvas de joaninhas *Baccha* sp. (Sirphidae), inimigos naturais de *D. opuntiae*. Os experimentos foram realizados em plantios de palma gigante infestada pela cochonilha-do-carmim, no município de Ouro Velho/ Paraíba. Os produtos foram pulverizados sobre os cladódios e, após oito dias, foram avaliadas as colônias vivas e mortas. Os produtos alternativos e os inseticidas causaram mortalidade acima 80% sobre o inseto. Os produtos alternativos não ocasionaram mortalidade de larvas de joaninhas, mas os inseticidas causaram a morte de larvas e adultos dos inimigos naturais.

Vanegas-Rico et al. (2010) investigaram as espécies de *Dactylopius* e seus inimigos naturais em Tlanepantla e Morelos, áreas de maior produção de cactos no México. *D. opuntiae* foi a única espécie encontrada além de ser identificados os seguintes inimigos naturais em ordem de abundância: *Leucopis bellula* Williston, *Symphorobius barberi* (Banks), *Laetilia coccidivora* (Comstock), *Hyperaspis trifurcata* Schaeffer, *Salpingogaster cochenillivorus* (Guerin-Meneville), *Symphorobius*

angustus (Banks) e *Chilocorus cacti* (L.). Essas informações são importantes para o uso do controle biológico e do manejo integrado de *D. opuntiae* nas plantações de cactos.

Falcão et al. (2013) avaliaram três cultivares de palma com diferentes níveis de tolerância a *D. opuntiae*: *O. ficus-indica* (Clone IPA20-sensível e F08-torelante) e a palma mexicana orelha de elefante (resistente), cultivadas em campo na presença da cochonilha. Foi analisada a cera epicuticular, açúcares solúveis, aminoácidos livres, proteína total, clorofila, índice de acidez, atividade da carboxilase do PEP e a produção de biomassa das palmas. A palma torelante foi mais eficiente na conversão de biomassa e produção de maior biomassa quando comparada com as demais. Os resultados confirmam que a cultivar tolerante deve ser cultivada no Nordeste brasileiro e também utilizada para o melhoramento das plantas.

Os inseticidas são usados no controle de altas populações, em especial os organofosforados são uma ferramenta comum no controle de *Dactylopius*, sendo os inseticidas mais utilizados Malatim, Paratim Metílico y Triclorfom (BADII e FLORES, 2001). Contudo, o uso indevido desses produtos pode causar prejuízos aos produtores e consumidores das palmas, sendo o uso de inimigos naturais uma alternativa para o controle desses insetos (VANEGAS-RICO et al. , 2010).

3.3 Cupins: aspectos taxonômicos e distribuição no mundo

Os cupins ou térmitas são insetos sociais da classe Insecta, ordem Isoptera, com mais de 2.900 espécies descritas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ZORZENON et al., 2006). Eles vivem em colônias populosas formadas por castas de indivíduos ápteros e alados, que são abrigados em ninhos, chamados de termiteiros ou cupinzeiros. Os indivíduos alados possuem dois pares de asas membranosas, de forma, estrutura e nervação semelhantes, daí o nome da ordem, que vem do grego (isos = igual; pteron = asas). Alimentam-se de materiais celulolíticos e lignolíticos e se desenvolvem por hemimetabolia, ou seja, o inseto apresenta metamorfose incompleta (CONSTANTINO, 2002; GALLO et al., 2002). A maioria das espécies não é considerada praga no meio urbano, e sua presença nas cidades, antes de ser deletéria é benéfica, estando presentes em jardins, parques e reservas florestais, decompondo elementos importantes para homeostase ambiental, sem causar prejuízos às edificações e jardins (MILANO e FONTES, 2002).

A ordem Isoptera é muito conhecida pelo seu potencial como praga, porém os cupins-praga constituem a minoria dentro do grupo (cerca de 10 %). Contudo, destaca-se o papel ecológico desses insetos que é primordial no ambiente, sendo considerados consumidores primários ou decompositores (herbívoros e detritívoros) nos ecossistemas naturais, realizando a reciclagem de nutrientes por meio da trituração, decomposição, humificação e mineralização de recursos celulósicos (COSTA-LEONARDO, 2002). Assim, os cupins possuem grande importância nos

ecossistemas tropicais, pois as modificações no ambiente vão desde alterações no aspecto visual da paisagem, pela construção de seus ninhos, como de microrrelevos de murundus, até modificações nas propriedades físicas e químicas do solo (HOLT e LEPAGE, 2000). Os cupins podem ser pragas em sistemas agrícolas (cana-de-açúcar, milho, arroz), florestais (eucalipto, pinus), urbanos (construções) e pastoris (pastagens) (BERTI-FILHO e FONTES, 1995). O alto índice da densidade das áreas urbanas favoreceu o aparecimento e a instalação de algumas espécies de cupins nessas áreas, as quais se tornam pragas devido à facilidade que esses possuem de se adaptar às mais variadas condições no meio urbano. As infestações por cupins vêm aumentando no Brasil e causam prejuízos nas cidades (ELEOTÉRIO e BERTI FILHO, 2000).

O Brasil tem uma das termitofaunas mais diversificadas do mundo, com cerca de 300 espécies, distribuídas nas seguintes famílias: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae. A família Termitidae possui uma diversidade de espécies, distribuídas em 100 gêneros nas regiões tropicais, sendo que cerca de 85% dos cupins conhecidos no território brasileiro compõem as seguintes subfamílias: Macrotermitinae, Apicotermitinae, Termitinae e Nasutitermitinae. Os cupins dessa família constroem diferentes e complexos ninhos; alimentam-se de madeira, de folhas, de húmus e alguns são cultivadores de fungos (CONSTANTINO, 1998, GALLO et al., 2002).

A subfamília Nasutitermitinae é a mais diversificada da ordem Isoptera, e algumas espécies desta subfamília atacam o madeiramento de construções em áreas urbanas do Brasil. O gênero *Nasutitermes* tem ampla distribuição mundial e é considerado o mais rico em variedades de espécies. Os cupinzeiros destes insetos podem ser formados por cerca de três milhões de indivíduos e a longevidade máxima da colônia varia entre 40 a 80 anos (KAMBHAMPATI e EGGLETON, 2000). Esse gênero possui cerca de 200 espécies identificadas, distribuídas nas regiões tropicais, nas quais constroem seus ninhos em troncos, nas raízes de árvore e acima ou abaixo do nível do solo (SCHEFFRAHN et al., 2002).

Os ninhos de *Nasutitermes* são conhecidos popularmente como cabeça de negro, construídos em árvores (ninhos cartonados) (Figura 4), enquanto algumas espécies também podem construir ninhos epígeos e subterrâneos. Nestes são encontrados operários dimórficos, robustos e escuros. (Figura 5a). Os soldados são dimórficos com cabeça globosa de coloração variada (preta ou marrom) com projeção cefálica chamada de nasuto bem desenvolvida, possuindo uma glândula frontal que secreta substância tóxica para proteção química, a qual ocupa quase toda a cavidade cefálica, e mandíbulas vestigiais; o corpo tem cor e coloração variáveis (cinza, alaranjada, marrom, etc) (Figura 5b). Os reprodutores alados são pigmentados, com asas escuras, sendo encontrados em áreas litorâneas devido ao hábito de construir ninhos em árvores (ZORZENON et al., 2006).



Figura 4. Cupinzeiros de *Nasutitermes corniger* em árvores localizadas na UFPE. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

As castas de operários e soldados forrageiam ativamente sobre o solo e não constroem túneis, mas os soldados são os primeiros a encontrar fontes alimentares, e avisam por meio de ferormônio às outras castas. A formação de novas colônias pode ser realizada por revoadas, onde casais de alados perdem as asas e originam o rei e a rainha, os quais fundam um novo cupinzeiro. Há relatos da presença de ninhos de *Nasutitermes* em residências, em vigas internas dos telhados e em sótão. Os cupins também constroem túneis nas paredes das residências próximos a focos dos insetos em árvores infestadas (COSTA-LEONARDO, 2002).

Buschini e Leonardo (1999) avaliaram o número de indivíduos reprodutivos presentes nas colônias de *Nasutitermes* sp. e também a estratégia utilizada na reprodução. Vinte e quatro ninhos foram coletados e uma única rainha e um rei foram encontrados em 17 deles, sendo que nos demais ninhos não foram encontrados estas castas, nem qualquer outro indivíduo reprodutivo. Os ninhos foram pesados, e os ovos postos pelas rainhas foram contados. Não foi encontrada relação entre o volume dos ninhos e o peso de suas respectivas rainhas, mas o número de ovos postos por rainhas durante uma hora correlacionou-se positivamente ao seu peso.

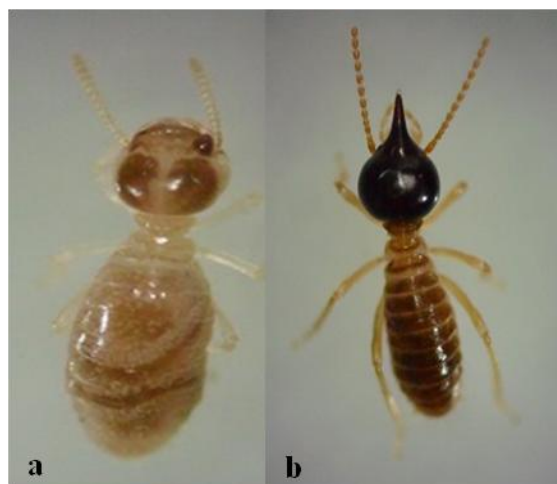


Figura 5. *Nasutitermes corniger*: operário (a) e soldado (b). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

Três categorias de cupins que causam danos econômicos são encontradas no Brasil: os cupins de madeira seca, os cupins subterrâneos e os cupins arborícolas. Estragos causados pelos cupins arborícolas em propriedades e bens são relatados no Brasil desde século XVI, sendo a maior parte das espécies pertencentes ao gênero *Nasutitermes*, todas da fauna nativa, comuns no país e consideradas pragas nas áreas urbanas (CUNHA, 1989; MILANO e FONTES, 2002). As infestações causadas por *Nasutitermes* são aparentes, pois as espécies constroem túneis em superfícies visíveis como paredes, tetos e pisos. As infestações podem ser disseminadas pelo solo, sob o piso e no entorno de paredes, por dentro e no trajeto de conduítes elétricos e telefônicos, de tubulações hidráulicas e, em pequenos espaços, dentro de paredes e pisos (FONTES e MILANO, 2002).

Na região Nordeste do Brasil são encontradas 31 espécies de térmitas distribuídas nas famílias Kalotermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae: *Anoplotermes* sp., *Nasutitermes callimorphus* Mathews, *N. corniger*, *N. Kemneri* Snyder & Emerson, *N. ephratae* (Holmgren), *N. macrocephalus* (Silvestri), *N. coxipoensis* (Holmgren), *N. longirostratus* (Holmgren), *Nasutitermes* sp., *Velocitermes* sp., *Diversitermes* sp., *Subulitermes* cf. *microsoma* (Silvestri), *Armitermes holmgreni* (Snyder), *Embirationes neotenicus* Holmgren, *Labiatermes labralis* (Holmgren), *Syntermes* sp., *Syntermes nanus* Constantino, *Syntermes grandis* (Rambur), *Rugitermes* sp., *Heterotermes longiceps* (Snyder), *Rhinotermes marginalis* (L.), *Amitermes amifer* Silvestri, *Cavitermes tuberosus*

(Emerson), *Cylindrotermes sapiranda* Rocha & Cancelli, *Microcerotermes exiguus* (Hagen), *M. struncki* (Sörense), *Neocapritermes opacus* (Hagen), *Termes medioculatus* Emerson, *Termes* sp., *Aparatermes* sp. *Ruptitermes* cf. *reconditus* (Silvestri); sendo que algumas dessas espécies causam danos no ambiente urbano (COSTA-LEONARDO, 2002; OLIVEIRA, 2011).

3.4 *Nasutitermes corniger*

Nasutitermes corniger é um cupim de ampla distribuição nas Américas, encontrado desde o Sul do México até o Norte da Argentina, sendo a mais frequente espécie em áreas que já sofreram algum distúrbio, registrada, também, em áreas de floresta primária. No Brasil, essa espécie ocorre em praticamente todo o território nacional e é considerado o mais comum e importante inseto-praga do gênero *Nasutitermes*, em especial nas áreas urbanas. Esse térmita constrói seu ninho em árvores, e muitas vezes é classificado erroneamente como: *Nasutitermes araujo* Roonwal& Rathore, *N. globiceps* Holmgren, *N. tatarendae* (Holmgren) e *N. costalis* (Holmgren) (CONSTANTINO, 2002; BANDEIRA et al., 2003; CONSTANTINO, 2009). Essa espécie é a praga estrutural mais importante em áreas urbanas do Brasil e em boa parte da América do Sul, sendo responsável por enormes danos a peças de madeira (CONSTANTINO, 2002; COSTA-LEONARDO, 2002; FONTES e MILANO, 2002; COSTA-LEONARDO et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Infestações de *N. corniger* afetam as edificações de interesse histórico na cidade de Corumbá, no Estado de Mato Grosso do Sul, sendo as árvores os principais reservatórios dos cupinzeiros arborícolas, em especial nos troncos da espécie *Delonix regia* (Bojer ex. Hook). Danos às construções e árvores foram assinalados nas áreas urbanas de Uberlândia e Brasilândia de Minas (Minas Gerais) e em Vitória (Espírito Santo) (FONTES e MILANO, 2002).

Costa et al. (2009) realizaram um levantamento das espécies de cupins-praga em Goiânia/GO, relacionando a distribuição desses cupins com alguns fatores ambientais. O estudo foi realizado por uma amostragem em 600 edificações de várias idades, localizadas em 20 bairros, e também analisaram os principais tipos de vegetação original. Foram registradas quatro espécies de cupins: *Coptotermes* sp., *Heterotermes tenuis* (Hagen), *H. longiceps* (Snyder) e *N. corniger*. A associação entre a frequência de infestação e o tipo de vegetação original apresentou baixa significância; entre as idades dos bairros e das edificações apresentou alta significância, enquanto as árvores próximas não podem ser consideradas uma causa importante do padrão de distribuição dos cupins.

Nasutitermes corniger é considerada a principal praga na maioria das cidades costeiras do Norte e Nordeste brasileiro, representando risco permanente para os edifícios históricos e suas coleções de objetos e documentos antigos, bem como arborizações e o madeiramento das

edificações. O térmita foi relatado nas seguintes cidades: Ilhéus e Iabuna (Bahia), Recife e Olinda (Pernambuco), João Pessoa (Paraíba), Fortaleza (Ceará), Alcântara (Maranhão), Belém (Pará) e Manaus (Amazônia) (MILANO e FONTES, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2012).

No Recife, observa-se a evolução de *N. corniger*, sendo que no início da infestação, a espécie já era considerada como praga, porém de menor importância, pois o cupim causava estragos nos batentes das portas e janelas, nos assoalhos, piso e telhados de pequenas casas e edifícios, além de construir, frequentemente, ninhos em árvores. Com o passar do tempo, as infestações ganharam maiores proporções devido à rápida ocupação do solo urbano, pois sendo o Recife uma cidade turística, os terrenos defronte ao mar, antes manguezais, sofreram a urbanização com a construção de edifícios, onde as infestações com *N. corniger* se agravaram, estendendo-se para os vãos estruturais dos prédios (FONTES e MILANO, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Sales et al. (2010) avaliaram a frequência e a riqueza de espécies de cupins em três áreas de reflorestamento com *Eucalyptus grandis* Hile ex. Maiden recém-colhido, da empresa Copener Florestal Ltda., nos municípios de Aramari, Santo André e Inhambupe, na região do litoral norte da Bahia. As amostras foram coletadas por meio de seis transectos de 100 m de comprimento por dois metros de largura, subdivididos em 20 parcelas (2 x 5 m) contíguas, sendo retiradas de cada subdivisão 12 amostras de 20 x 20x 20 cm de profundidade, das quais foram coletadas 21 espécies de cupins, pertencentes a duas famílias e 16 gêneros. Os autores consideraram dez espécies dominantes, todas da família Termitidae, sendo *Amitermes amifer* Silvestri e *N. corniger* as de maior frequência.

Silva et al. (2012) estudaram a ocorrência de infestações de *N. corniger* em áreas urbanas e suburbanas do município de Cruzeiro do Sul, Acre. Amostras de cupins foram coletadas de árvores e edificações, preservadas em álcool 70 % e identificadas. Foi constatada a ocorrência de *N. corniger* tanto nas árvores como nas edificações, sendo a mangueira (*Mangifera indica* L.) e abacateiro (*Persea americana* Mill.) as principais espécies arborícolas atacadas. Algumas árvores infestadas também serviam de suporte para a nidificação do cupim. Dentre as madeiras utilizadas na construção civil, o louro-preto (*Ocotea* sp.) e a tauari (*Allantoma* sp.) foram as mais acometidas por *N. corniger*. Portanto, amplia-se a região de abrangência geográfica dessa espécie neotropical na Amazônia, todavia, destacando-se como praga em áreas urbanas e suburbanas de Cruzeiro do Sul.

O térmita *N. corniger* usa apenas a defesa química para proteger a colônia contra os predadores, sendo que a sua secreção de defesa é constituída principalmente por monoterpenos e diterpenos (PRESTWICH et al., 1985). Estudos foram realizados por Azevedo e Neto (2007) para analisar os componentes químicos voláteis (terpenos) presentes na secreção de defesa de *N. corniger*, coletado de três colônias localizadas na região urbana de Goiânia e compararam o perfil dessa secreção com dados da literatura, visando avaliar a variabilidade desses terpenos. Os dados das cromatografias

determinaram a presença de 15 terpenos na secreção de defesa, sendo estes classificados como monoterpenos nas seguintes proporções: α -pineno (32%), canfeno (0,5%), sabineno (3,6%), β -pineno (19%), mirceno (1%), careno (2,5%), α -felandreno (1,6%), d-3-careno (17%), α -terpineno (0,5%), silvestreno (1,3%), limoneno (15%), Z-ocimeno (1%), g-terpineno (0,4%) e terpinoleno (1,5%). Entretanto, houve enorme variação das quantidades de alguns monoterpenos por colônia, como o α -pineno que correspondeu a 53,1% das substâncias presente na colônia três e, apenas 19% e 22% das colônias um e dois, respectivamente. Os indivíduos de *N. corniger* coletados apresentaram secreção de defesa química com grande variabilidade quantitativa em relação aos dados da literatura, que pode ser um reflexo do ambiente em que foram coletados os térmitas avaliados na literatura. O perfil químico da secreção defensiva pode ser útil na análise taxonômica de térmitas e como auxiliar taxonômico, associado a dados morfológicos.

Paes et al. (2007) avaliaram a resistência natural de sete madeiras [leucena (*Leucaena leucocephala* Lam), louro pardo (*Cordia trichotoma* Vell), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Poirer), marmeleiro preto (*Croton sonderianus*), sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth), nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.) e teca (*Tectona grandis* L.)] à espécie *N. corniger* em ensaio de preferência alimentar. As amostras de cada espécie foram submetidas, durante 45 dias, à ação dos cupins em laboratório, sendo avaliada a perda de massa e o desgaste causado nos pedaços de madeira. A madeira de louro pardo, jurema-preta e sabiá foram as mais resistentes, enquanto a madeira de leucena, nim e marmeleiro foram as menos resistentes. Ainda, foi constatada baixa relação entre a densidade e a resistência natural das madeiras aos cupins.

Nasutitermes corniger ataca madeiras duras ou moles, secas ou úmidas, manufaturadas ou não, tendo preferência por madeira de *E. grandis*, porém em áreas urbanas esse cupim ataca substratos celulósicos, de origem distinta. O comportamento de forrageamento dessa espécie em direção a substratos celulósicos distintos foi analisado. Os cupins provenientes de um ninho mantido em laboratório foram liberados numa arena de forrageamento com substratos celulósicos (5,0 x 2,0 x 2,0 cm) de madeiras de *Pinus elliottii* Englen, *E. grandis*, bagaço de *Saccharum officinarum* L. e papelão corrugado. Para o teste, foi verificada a ocorrência de recrutamento massivo de operários em cada substrato celulósico, e após uma hora, os cupins presentes em cada substrato foram retirados e contados. O recrutamento massivo de operários foi verificado em todos os substratos, sendo em maior número nos testes com *E. grandis* (85%) e *P. elliottii* (92%) do que no de bagaço de *S. officinarum* (54%) e no de papelão corrugado (46%). No entanto, número similar de cupins foi recrutado para madeira de *E. grandis*, *P. elliottii*, bagaço de *S. officinarum* e para o papelão corrugado. Foi comprovado que *N. corniger* estabelece seu forrageamento de forma mais frequente nas madeiras de *E. grandis* e *P. elliottii* do que nas outras fontes celulósicas testadas (GAZAL - SLVA et al., 2008).

3.5 Controle biológico de insetos-praga

A partir da conscientização mundial sobre os riscos na utilização de inseticidas químicos, bem como, a necessidade de se reduzir o uso destes, procuram-se produtos eficientes no controle de pragas, em especial, utilizando os microrganismos (VILAS-BOAS et al., 1992; DALZOTO e UHRY, 2009). O controle químico normalmente é utilizado quando o dano causado pela praga já está consolidado e necessitando de uma resposta rápida. O controle biológico é um fenômeno natural que regula o número dos organismos-praga por inimigos naturais, os quais atacam os vários estágios do ciclo de vida destes organismos. Dentre as classes dos inimigos naturais de insetos, destacam-se os agentes entomopatogênicos como: fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, etc. Os chineses foram os primeiros a relatar, no século III, a existência dos inimigos naturais como biocontroladores, ao usar formigas predadoras sobre insetos-praga dos citros. Por volta de 1830, os microrganismos (fungos, bactérias e protozoários) foram identificados como agentes causais de doenças em insetos, sendo que a primeira tentativa de controle de insetos por estes patógenos foi realizada em 1870 (GALLO et al., 2002; ONOFRE et al., 2002; LAZZARINI, 2005). Os inseticidas naturais não atuam sobre as populações não-alvo, são biodegradáveis e disponíveis mundialmente, e interferem no crescimento e na reprodução das pragas, sendo eficazes nas diferentes fases do desenvolvimento dos organismos-praga (SUKUMAR et al., 1991).

Os programas de controle biológico de pragas mostram grande interesse no mundo, em função do novo direcionamento internacional do setor agrícola, de conscientizar o uso sustentável dos recursos biológicos e dos bons resultados alcançados (SILVA et al., 2006). Existem três técnicas para a aplicação do controle biológico: o controle biológico clássico, que consiste na introdução de um inimigo natural exótico no ambiente afetado por uma praga, visando o estabelecimento definitivo deste na área de introdução; o controle biológico aumentativo, que é a introdução de inimigos naturais existentes na área, mas que possuem poucas condições de se manter no local por longo período ou não apresentam densidade populacional suficiente para diminuir a população da praga e; o controle biológico conservativo, que consiste em alterar o ambiente, favorecendo a população dos inimigos naturais (ERTHAL JÚNIOR, 2011).

Contudo, os bioinseticidas são utilizados em baixa escala no mercado mundial (1% do volume de defensivos agrícolas), enquanto os produtos químicos correspondem a cerca de 30%. As formulações de inseticidas de natureza fúngica correspondem a 15% no mercado mundial de bioinseticida (ALMEIDA e BATISTA-FILHO, 2001). Portanto, a busca por alternativas para o controle de insetos-praga, visando o baixo impacto ambiental, é alvo de constantes pesquisas, sendo o uso de agentes entomopatogênicos um método eficiente e seguro que vem se consolidando no

Brasil e em outros países (MOINO JÚNIOR, 2000).

O controle microbiano utiliza os microrganismos visando à manutenção da população de pragas em níveis não prejudiciais. O uso destes entomopatógenos deve fazer parte de um conjunto de medidas que atuem em harmonia com o ambiente, sendo capazes de reduzir a população de pragas aos níveis de danos econômicos (GALLO et al., 2002). Os fungos foram os primeiros agentes a serem usados no controle microbiano, sendo os principais patógenos de insetos, além de causar 80 % de suas doenças. Estes podem infectar todos os estágios do ciclo de vida do hospedeiro, penetrando por diversas vias, em especial, por meio do tegumento, e têm alta capacidade de disseminação pelos esporos, os quais são levados por diferentes agentes de dispersão (ALVES, 1998; ONOFRE et al., 2002). As vantagens desses patógenos em relação aos produtos químicos consistem na eficiência, no custo, na segurança para o homem e o ambiente, na redução dos resíduos tóxicos nos alimentos e na preservação dos inimigos naturais (FARIAS e MAGALHÃES, 2001). Os fungos entomopatogênicos considerados mais importantes encontram-se nos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticilium*, *Nomuraea*, *Isaria*, *Entomophthora*, entre outros (ALVES, 1998; ONOFRE et al., 2002).

No Brasil, um grande número de espécies de fungos entomopatogênicos ocorre naturalmente e mantém as pragas sobre controle. No mercado brasileiro, diversas formulações à base de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill têm sido utilizadas no controle de algumas pragas, como as cigarrinhas, broca-do-café e em áreas de cultivo da seringueira (GALLO et al., 2002). Esses fungos após matar o inseto-praga, produzem micélio sobre o cadáver que originam um número significativo de conídios, sendo que a maioria destes se desintegra rapidamente no ambiente, e aqueles que permanecem viáveis podem infectar outros insetos (MEYLING e EILENBERG, 2007).

O sucesso dos fungos no controle de insetos depende inicialmente da aderência de seus conídios ao tegumento do hospedeiro, sendo isso possível pelas interações hidrofóbicas entre os conídios e a cutícula do inseto (BIDOCHKA e ST LEGER, 1997). Em seguida, o conídio germina e produz tubo germinativo e os apressórios, os quais penetram a cutícula do inseto pela utilização da pressão mecânica e química (enzimas) por meio da degradação dos componentes da cutícula. O fungo atinge a hemolinfa do inseto, nutre-se e produz toxinas que afetam as células do hospedeiro ocasionando sua morte (AZEVEDO, 1998; ALVES, 1998; TIAGO e FURLANETO, 2003).

A utilização de extratos vegetais é uma técnica praticada desde a Idade Antiga e em seu domínio constam mais de 2.000 espécies vegetais com propriedades inseticidas. Espécies vegetais são usadas na medicina popular como agente antimicrobiano, antiinflamatório, hipoglicemiante, com potencial para uso biotecnológico industrial (LEITE et al., 2006; LEITE et al., 2007), e apresentam ação inseticida contra insetos-praga (SÁ et al., 2009). A ação dos extratos é mediada por

metabólitos secundários, tais como alcalóides, taninos, terpenóides, glicósdeos, entre outros (VIEGAS JÚNIOR, 2002; MELLO e SILVA-FILHO, 2002). Os vegetais produzem substâncias bioativas que são inofensivas ao homem e meio ambiente, sendo consideradas fontes alternativas na descoberta de inseticidas naturais (LUNA et al., 2005; OMENA et al., 2007). Espécies botânicas produzem substâncias secundárias como terpenos e fenilpropanóides, que podem ter ação inseticida, deterrente e atrativas para os insetos (MELO-SANTOS et al., 2009).

Os inseticidas vegetais foram usados bem antes dos inseticidas sintéticos, em especial nos países de clima tropical, pelo maior índice de pragas agrícolas nessas regiões. Esses bioinseticidas foram substituídos pelos inseticidas sintéticos, visto que estes produtos eram aparentemente mais eficientes no controle de pragas (VIEIRA et al., 2001). O uso desses agrotóxicos causa efeitos indesejáveis, como a seleção de insetos-praga resistentes, a contaminação do solo, água, fauna e do próprio homem, além de aumentar os custos na produção de alimentos (GRAVENA et al., 2003). Estudos vêm sendo realizados na descoberta de inseticidas de origem vegetal, os quais são considerados mais seguros pela opinião pública que os inseticidas sintéticos (SCHLÜTER, 2006). Portanto, há necessidade de se encontrar alternativas para substituir os inseticidas sintéticos, que sejam viáveis para o ambiente e para a economia dos países, quando usados no controle de pragas. Os inseticidas de origem vegetal são promissores no controle biológico, devido a sua eficácia, uma vez que são facilmente biodegradáveis e de baixo custo (DHARMAGADDA et al., 2005; KIRAN et al., 2006).

Os metabólitos secundários dos vegetais estão associados com a adaptação, transporte de íons metálicos e processos de simbiose, além de atuarem como hormônio e substâncias de defesa (DAMAIN e FANG, 2000). As plantas usam a defesa química contra os ataques de parasitas e predadores, sendo esta defesa mediada por metabólitos primários, como proteínas e lipídios; e metabólitos secundários, os quais mostram efeitos repelentes, deterrentes, inibidores e tóxicos na defesa (CAVALCANTE et al., 2006). A produção dos metabólitos para defesa pode ser induzida por estresse hídrico, variações sazonais de temperatura e luminosidade, e ataques de parasitas e predadores (BULBOVAS et al., 2005).

3.5.1 Controle biológico de cochonilhas por fungos entomopatogênicos

Estudos sobre a utilização de fungos entomopatogênicos no controle de diferentes espécies de cochonilha são realizados por pesquisadores brasileiros, cujos resultados se mostram promissores. Assim, Andaló et al. (2004), analisaram a eficiência de 81 linhagens de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, no controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* (Tinsley), e verificaram que as linhagens de *B. bassiana* foram mais eficientes no controle do inseto, com maior

porcentagem de mortalidade, quando comparadas com as linhagens de *M. anisopliae*, sendo selecionada *B. bassiana* UEL114 para ser testada no controle da cochonilha.

Garcia e Alves (2005) avaliaram a ação de 50 linhagens de oito espécies de fungos entomatógenos sobre a cochonilha dos citros, *Orthezia praelonga* Douglas, visando à seleção e utilização das linhagens mais eficientes como inseticida microbiano. Os autores constataram que 30 linhagens foram patogênicas às ninfas da cochonilha, sendo as linhagens de *Verticillium lecanii* (Zimmerman) (ESALQ972 e ESALQ1300) as mais promissoras. Alves et al. (2007) analisaram a patogenicidade de *M. anisopliae* sobre adultos de *Planococcus citri* (Risso) em teste de laboratório e observaram que o entomopatógeno causou um índice de mortalidade elevado, entorno de 80% dos indivíduos, em 14 dias após a infecção dos insetos por suspensão fúngica.

Espécies de *Fusarium* podem ser encontradas sobre plantas e insetos, porém são consideradas pouco virulentas e eficientes no controle de insetos, exceto as espécies que ocorrem sobre as cochonilhas (coccídeos) nos pomares do Brasil, como *Fusarium lateritium* Nees. Este produz toxina semelhante à beauvericina, produzida por *B. bassiana*, a qual é utilizada pelo fungo para controlar o inseto (ALVES, 1998).

Dactylopius opuntiae é parasitado no campo por um fungo de cor rosa que foi isolado de palmas infestadas provenientes do Sertão de Pernambuco e identificado por meio da técnica de ITS, como *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, que produz também a beauvericina. Essa toxina é um hexadepsipetideo com ação inseticida, pois inibe a colesterol aciltransferase, sendo altamente tóxica para os insetos (LYRA et al., 2008).

O controle biológico da cochonilha *P. citri*, uma das principais pragas em citros, é feito pela liberação de parasitóides e predadores. Demirci et al. (2011a) avaliaram a eficiência de *I. farinosa* sobre o inseto, nos diferentes estágios, sendo que a mortalidade diminuiu de acordo com a diminuição do nível da umidade e a densidade do inóculo, demonstrando a eficácia do fungo para biocontrole de *P. citri*.

Menezes et al. (2008) estudaram a ação patogênica de linhagens de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra ninfas de *D. opuntiae*, em palma forrageira. *B. bassiana* foi mais eficiente, causando a morte cumulada de 96,80% das ninfas.

Demirci et al. (2011b) analisaram o efeito de alguns fungicidas usados contra doenças cítricas sobre o crescimento micelial e a germinação conidial de *I. farinosa* e também testaram a ação do fungo sobre *P. citri*. Os fungicidas sistêmicos Astebuconazole, Penconazol e Nuarimol não afetaram a germinação de conídios e o crescimento micelial. Por outro lado, os fungicidas Captan, Chlorothalonil, Mancozeb e Propinebe, nas concentrações entre um e cinco µg/mL, inibiram a germinação conidial, enquanto Captan, Chlorothalonil e Propinebe não inibiram o crescimento micelial na concentração de cinco µg/mL. Por outro lado, Mancozeb inibiu o crescimento micelial

nas concentrações testadas. Os autores observaram também que o Enxofre, Oxicloreto de cobre, Fosetilal, Chlorothalonil e Carbendazim não diminuíram a porcentagem de mortalidade causada por *I. farinosa*. Enquanto os produtos Tebuconazol, Penconazol e Mancozeb reduziram a mortalidade sobre as larvas e as fêmeas adultas.

3.5.2 Controle biológico de cupins por fungos entomopatogênicos

O primeiro relato de fungos no controle natural de cupins foi descrito por Tate (1928) que observou dois gêneros de fungos (*Ectomyces* e *Termitaria*) parasitando insetos da ordem Isoptera. Hendee (1933) estudou a associação de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* com os cupins *Kaloterms minor* (Hagen), *Reticulitermes hesperus* Banks e *Zootermopsis augusticollis* (Hagen), constatando que os cupins transportavam os esporos e hifas dos fungos, dispersando-os pela colônia.

Bao e Yendol (1971) avaliaram a histologia e o comportamento de *Reticulitermes flavipes* Kollar infectados com *B. bassiana*, observando que a capacidade de se agruparem foi reduzida, bem como a perda de sensibilidade aos estímulos táteis e de coordenação, ocorrendo a paralisia e morte dos insetos entre 24 e 36 horas.

Com base no potencial fúngico para controle de insetos-praga, Hanel (1981) testou a virulência de *M. anisopliae* contra os operários de *Nasutitermes exitiosus* (Hill), utilizando a concentração $1,29 \times 10^7$ conídios/mL. Após 11 dias foram mortos mais de 95% dos operários. Esses resultados mostraram que *M. anisopliae* é um agente promissor para o controle de *N. exitiosus*. Ainda, Hanel (1982) selecionou linhagens de *Conidiobolus obscurus* (Hall & Dunn) Remaudiere, *Entomophthora virulenta* Hall & Dunn, *E. destruens* Weiser & Batko, *M. anisopliae* e *Absidia coerulea* Bainier, utilizando os seguintes critérios: infectividade sobre os operários, soldados e ninfas de *N. exitiosus*; crescimento e esporulação dos fungos em diversas temperaturas. Entre as espécies testadas, apenas *M. anisopliae* mostrou resultados satisfatórios para o controle desse cupim.

Outros estudos realizados por Lai et al. (1982) sobre a patogenicidade de *B. bassiana*, *Beauveria* sp. e *M. anisopliae* contra operários de *C. formosanus*, por meio da determinação dos valores da DL_{50} e do TL_{50} , mostraram que *M. anisopliae* foi mais eficiente do que *B. bassiana* no controle de *C. formosanus*, sendo *M. anisopliae* MM773 mais patogênica entre as linhagens testadas. Também Alves et al. (1995) analisaram a eficiência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar) em pastagens, situadas em São Paulo. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de 6 g de formulação contendo 2 g de conídios adicionados em arroz. Em 19 dos 20 ninhos tratados com *M. anisopliae*, 100% dos cupins foram mortos. Outras

formulações foram eficientes para o controle de cupins, de modo que a patogenicidade de *M. anisopliae* sobre *C. acinaciformis* e *N. exitiosus* foi avaliada por Rath e Tidbury (1996); com aplicações de $1,8 \times 10^7$ conídios/mL de *M. anisopliae* DATF001 e $1,2 \times 10^8$ conídios/mL de *M. anisopliae* ATCC62176 sobre a superfície dorsal dos operários e obtiveram 100% de mortalidade, após quatro dias de inoculação.

A suscetibilidade dos cupins *C. acinaciformis* e *N. exitiosus* foi testada para *M. anisopliae* FI610 sobre umidade relativa abaixo de 86%. Os estudos mostraram que não houve efeito consistente da umidade sobre a patogenicidade, mas a esporulação nos cadáveres dos insetos ocorreu apenas em umidade acima de 93%. Assim, o microclima em torno dos cupins vivos foi suficiente para promover a infecção em condições de campo, sendo a umidade um fator limitante para a eficiência do fungo no controle dos cupins (MILNER et al., 1997).

Pesquisas foram realizadas na Austrália, visando o controle dos cupins *Coptotermes frenchi* (Hill), *C. acinaciformis* e *N. exitiosus* por *M. anisopliae* (MILNER et al., 1998). Os autores testaram, *in vitro*, 93 isolados do patógeno e selecionaram *M. anisopliae* FI610, por apresentar características desejáveis para o controle dos térmitas, tais como: alta patogenicidade, crescimento a 36 °C, estabilidade genética e ótima esporulação. Esse isolado também foi eficiente quando aplicado (3×10^{11} conídios/mL) no campo, sobre colônias de *C. acinaciformis*.

O setor de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) desenvolveu o método de iscas atrativas (Temitrap), nas quais são inseridos fungos entomopatogênicos virulentos aos cupins, associados ou não a inseticidas, também eficazes no controle dos insetos. Experimentos no campo demonstraram que uma unidade de isca pode atrair até milhares de operários e soldados. Estes são estressados pelo inseticida, tornando-se mais vulneráveis ao patógeno. Após a morte do inseto, o fungo é facilmente dispersado pelos esporos a outros cupins existentes na área de alimentação (ALVES, 1998). Com a mesma finalidade, Almeida et al. (1998) avaliaram o controle de *H. tenuis* utilizando iscas Temitrap, impregnadas com baixas concentrações de inseticidas (Imidacloprid e Thiamethoxan), sozinho ou associado a *B. bassiana* 634. A pesquisa foi realizada na Fazenda São José, em Rio Claro, São Paulo. Os tratamentos com os inseticidas associados ao fungo foram os mais eficientes, pois apresentaram mortalidade de 100% após oito dias da inoculação, e esta combinação não causou repelência ao inseto. Esta técnica pode tornar viável o uso de fungos entomopatogênicos no controle de térmitas, contribuindo para a redução dos danos ao homem e ao meio ambiente.

Rath (2000) enfatiza que a organização social dos cupins é um fator essencial na disseminação de fungos dentro da colônia, facilitando assim o controle desses insetos por meio do tratamento das áreas de alimentação. Mas, a ação defensiva destes insetos, como: a remoção e o isolamento dos espécimes infectados por fungos, enterramentos dos cupins mortos juntos com

componentes inibidores e secreções defensivas, pode limitar a disseminação desses patógenos dentro da colônia.

Rosengaus et al. (2000) estudaram as propriedades antifúngicas dos principais componentes terpenóides das secreções da glândula frontal de soldados, por meio da incubação de suspensões de conídios de *M. anisopliae* com as substâncias α -pinene e limonene, em diferentes concentrações. Os bioensaios *in vitro* mostraram que estas substâncias reduziram a germinação dos conídios por meio do contato direto ou indireto (vapor). As espécies de *Nasutitermes* foram menos suscetíveis à infecção, provavelmente devido às propriedades antifúngicas do α -pinene e do limonene, utilizadas pelos cupins na defesa química, enquanto os soldados de *C. formosanus* contaram apenas com a defesa mecânica. As substâncias também foram testadas em grupos compostos pelas castas de soldados e operários e grupos formados por apenas uma casta. Os resultados indicaram que a composição dos grupos e a interação social dos cupins têm um papel importante na determinação da suscetibilidade à infecção fúngica.

Sun et al. (2002) quantificaram a esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre operários de *C. formosanus*. Os autores classificaram os fungos em dois grupos distintos: os isolados de *B. bassiana* foram incluídos no grupo com alta esporulação total (11 dias) e baixa velocidade de esporulação (dois e três dias), enquanto os isolados de *M. anisopliae* formaram outro grupo, por apresentar alta velocidade de esporulação e baixa esporulação total. Essas características podem dar vantagem a *M. anisopliae* sobre *B. bassiana* no controle de cupins, devido ao comportamento social de defesa desses insetos. Ainda, a produção de conídios foi significativamente maior *in vitro* do que *in vivo*. A correlação positiva foi mostrada, permitindo testes preliminares *in vitro* de muitos isolados para se obter uma maior esporulação *in vivo*.

Wright et al. (2002) avaliaram a disseminação e a eficiência, *in vitro*, de *M. anisopliae* e *B. bassiana* entre operários de *C. formosanus*, provenientes de quatro ninhos do campo, por contato direto destes com as culturas fúngicas. Os cupins expostos aos fungos foram depois associados ao mesmo número de insetos não expostos. A mortalidade dos cupins foi determinada uma semana depois da exposição, sendo *B. bassiana* mais eficiente, apresentando maior percentual de mortalidade do que *M. anisopliae*.

Estudos feitos em laboratório e no campo demonstraram a eficiência de *M. anisopliae* F1610 no controle dos cupins *Coptotermes lacteus* (Froggatt) e *N. exitiosus*. Fatores comportamentais são responsáveis por limitar a dispersão de epizootias dentro das colônias dos térmitas; mas testes de campo têm mostrado que, quando quantidades suficientes de conídios são bem distribuídas na área central do cupinzeiro (centro de reprodução), são eficientes na mortalidade das colônias de *C. lacteus* e de *N. exitiosus*. A repelência dos térmitas às iscas utilizadas é um fator limitante para o controle. Os autores usaram dois métodos para minimizar a repelência. No primeiro método foram

utilizados isolados menos repelentes e moderadamente virulentos. O segundo consistiu na utilização de várias formulações para evitar a repelência. Formulações aquosas de *M. anisopliae* F1610 mostraram resultados promissores (MILNER, 2003).

O efeito da virulência, esporulação e temperatura na transmissão *in vitro* de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *C. formosanus* foi analisado por Sun et al. (2003). Em isolados de *M. anisopliae*, a esporulação teve maior efeito que a virulência na produção de epizootias, o que não ocorreu com *B. bassiana*. Entretanto *M. anisopliae* F3045, que apresentou alta virulência e esporulação, causou maior mortalidade aos cupins, quando comparado com as outras linhagens, sendo esta combinação eficiente na transmissão dos patógenos. Na temperatura de 35°C, a germinação e a transmissão fúngica foram significativamente reduzidas e *M. anisopliae* foi o mais eficiente em causar epizootias a 27°C. Portanto, outras características, além da virulência, tais como esporulação e tolerância à temperatura podem determinar o sucesso dos fungos entomopatogênicos no controle de cupins e de outros insetos-praga.

Wang e Powell (2003) isolaram seis linhagens de *B. bassiana* de *R. flavipes* e de *C. formosanus*, na China. Os autores avaliaram a patogenicidade dessas linhagens e compararam com *B. bassiana* ATCC20367, que foi isolada do inseto *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Todas as linhagens causaram mortalidade aos cupins entre o 4º e o 8º dia após inoculação, não apresentando diferenças significativas entre as mesmas. Em seguida, a virulência de seis linhagens de *B. bassiana* e de duas de *M. anisopliae* sobre operários de *R. flavipes* foi comparada, tendo *M. anisopliae* causado maior patogenicidade ao cupim.

A descrição do desenvolvimento externo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em operários e soldados de *C. cumulans* foi analisada por Neves e Alves (2004), utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), observando o tempo de duração das fases de infecção fúngica. O desenvolvimento dos fungos foi similar, no entanto a colonização e a conidiogênese foram mais rápidas para *B. bassiana* do que para *M. anisopliae*, não apresentando diferenças na germinação e na penetração dos mesmos. A mortalidade superior a 80%, entre 48 e 72 horas após a inoculação, indicou a alta virulência de *B. bassiana*.

Wang e Powell (2004) testaram a eficiência de *M. anisopliae* SRRC2558 (isolado de *C. formosanus*) contra os cupins *C. formosanus* e *R. flavipes*, *in vitro* e compararam com outras três linhagens de *M. anisopliae*. Verificaram que *M. anisopliae* SRRC2558 foi altamente patogênica contra os cupins, matando 100% dos operários de *R. flavipes*, em recipientes com meio vermiculita/areia. Entretanto, tratamentos com concentrações superiores a $1,5 \times 10^7$ conídios/mL causaram repelência aos operários. Tratamentos com iscas de celulose contendo *M. anisopliae* SRRC2558, nas concentrações $1,5 \times 10^8$ e 3×10^8 conídios/mL, causaram 100% de mortalidade para os grupos de operários de *R. flavipes* e de *C. formosanus*, não sendo repelentes aos cupins. Assim, o

uso de iscas de celulose, associadas às linhagens virulentas pode ser um método promissor no controle de cupins subterrâneos.

A ação dos entomopatógenos *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* Driver, Milner & Trueman contra *N. coxipoensis* e a esporulação sobre os insetos mortos foram avaliadas em laboratório. Os cupins (soldados e operários) foram infectados por contato direto com as culturas fúngicas, após 12 dias de crescimento, a partir das doses (conídios/mL) preestabelecidas. Após três dias de inoculação, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou percentual de mortalidade de 95,7% (dose A: $0,5 \times 10^6$) e 100% (dose B: $1,6 \times 10^7$), enquanto *M. anisopliae* var. *acridum* causou mortalidade de 66,4% (dose A: $1,4 \times 10^5$) e 88% (dose B: $1,8 \times 10^6$). A produção de conídios foi mais significativa para *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Esses resultados indicaram o maior potencial de *M. anisopliae* var. *anisopliae* para o controle de *N. coxipoensis* (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Meikle et al. (2005) coletaram três isolados de *B. bassiana* e um isolado de *I. fumosorosea* de espécimes de *C. formosanus*, provenientes de Hong Kong, China. Em bioensaios preliminares, *I. fumosorosea* Pfu02031 foi o mais eficiente entre os isolados, matando 100% dos insetos. Em seguida, este isolado, junto com o isolado comercial *M. anisopliae* (Bioblast), foram testados contra *C. formosanus*, em laboratório. Nos experimentos em que todos os cupins foram pulverizados, não houve diferença significativa entre os fungos. Entretanto, quando os cupins infectados foram agrupados com os não infectados, *I. fumosorosea* Pfu02031 foi mais patogênico, apresentando menor média de sobrevivência dos insetos. Ainda, a esporulação deste isolado nos cadáveres dos cupins agrupados e não agrupados foi superior a *M. anisopliae*, sendo este o mais apropriado para os testes de biocontrole do cupim no campo.

Wright et al. (2005) avaliaram a eficiência de *M. anisopliae* C4-B (isolado de alados de *C. formosanus*) sobre operários e alados de *C. formosanus* e compararam com o isolado comercial *M. anisopliae* ESC1. O isolado *M. anisopliae* C4-B foi mais patogênico, causando 100% de mortalidade sobre os alados e operários. Ao testar a transferência deste isolado de operários infectados para os não infectados, os autores observaram que 62,8% dos operários morreram, sendo que apenas 20% destes foram expostos ao fungo. Esse isolado também mostrou eficiência ao ser aplicado em campo contra os alados, causando 100% de mortalidade. Este foi o primeiro registro do uso de fungos entomopatogênicos para o controle, *in vitro* e no campo, de alados sendo este controle importante, pois esta casta é responsável pela fundação de novas colônias.

Yanagawa e Shimizu (2007) examinaram a suscetibilidade de *C. formosanus* a *M. anisopliae* em laboratório. Quando tratados individualmente, os operários foram altamente suscetíveis ao fungo, nas concentrações $4,2 \times 10^6$ e $5,1 \times 10^6$ conídios/mL, causando 100% de mortalidade após quatro dias de inoculação. Entretanto, quando os operários foram agrupados a mortalidade atingiu apenas 40 e 30% dos insetos, mostrando assim a resistência destes a *M. anisopliae*. Também os

autores observaram que 80% dos conídios foram removidos da cutícula dos cupins agrupados após três horas de inoculação, pelo processo de limpeza (grooming), protegendo-os da infecção fúngica.

Segundo Passos (2008), distúrbios fisiológicos ocasionados por um patógeno ativam reações de defesa pelos insetos, como respostas humorais e celulares (hemócitos). Assim, o autor analisou a patogenicidade de isolados de *I. farinosa* e *I. fumosorosea* sobre *C. gestroi*, além de avaliar a produção de hemócitos em operários após serem tratados com o isolado mais patogênico e virulento. Todos os isolados foram patogênicos, sendo que *I. farinosa* URM4995 foi selecionado para a determinação da CL₅₀, estimada em $6,7 \times 10^5$ conídios/mL, e para o estudo da resposta imunológica celular. A média total de hemócitos encontrada na hemolinfa dos operários tratados com *I. farinosa* URM4995 (1×10^7 conídios/mL) não diferiu dos hemócitos produzidos pela testemunha, nos intervalos de 12, 24, 36 e 48 horas. Com relação aos tipos celulares produzidos, as células mais frequentes foram plasmatócitos. Os resultados das contagens total e diferencial demonstraram que a linhagem não interferiu quantitativa e qualitativamente no número de hemócitos de *C. gestroi* e que tal patógeno apresenta-se como promissor para o controle deste inseto.

Cunha et al. (2009) caracterizaram os hemócitos de operários de *N. coxipoensis* e quantificaram os tipos celulares após 24, 48 e 72 horas de inoculação com *M. anisopliae*. Os autores identificaram seis tipos de hemócitos: plasmatócito, granulócito, esferulócito, prohemócito, adipohemócitos e oenocitóide. Não foi evidenciada alteração na morfologia dessas células durante os intervalos analisados. Entretanto, houve variações na proporção dos hemócitos em relação à testemunha para os hemócitos esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides, nos três intervalos de avaliação, e para plasmatócitos e granulócitos no intervalo de 48 horas.

Foram realizados estudos sobre o controle de *C. cumulans* em 49 montículos localizados nas áreas de pastagens do Pólo Regional Centro Sul, em Piracicaba, com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em diferentes doses e formulações. Estes foram produzidos pela empresa Itaforte BioProdutos Ltda, nas formulações tipo pó molhável (PM) e suspensão oleosa (SO), sendo aplicados isoladamente ou associados, nos seguintes tratamentos: *M. anisopliae* SO 20 mL + 1000 mL de água; *M. anisopliae* SO 30 mL + 1000 mL de água; *B. bassiana* PM 10 g; *B. bassiana* PM 20 g; *B. bassiana* PM 10 g + *M. anisopliae* PM 20 g; *B. bassiana* PM 10 g + *M. anisopliae* SO 20 mL + 1000 mL de água; e o controle. Os fungos foram eficientes no controle do cupim, sendo que os melhores índices de mortalidade foram obtidos com os tratamentos *M. anisopliae* 30 mL + 1000 mL de água com 100% de eficiência; *B. bassiana* 10 g + *M. anisopliae* 20 mL + 1000 mL de água com 85,71% de eficiência; *M. anisopliae* 20 mL + 1000 mL de água com 71,42% de eficiência. Os demais tratamentos não diferiram do controle (GUIRADO et al., 2009).

Toscano et al. (2010) também analisaram a eficiência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* no

controle de *C. cumulans*. Os autores testaram duas formas de aplicação (polvilhamento e a via líquida) em três tamanhos de cupinzeiros (pequeno, médio e grande), sendo utilizados os seguintes tratamentos: testemunha – sem aplicação; M103 (*M. anisopliae*) – 10 g/montículo – polvilhamento; Metarril® M103 – 10 g/montículo – via líquida; Metarril® M103 – 15 g/montículo – polvilhamento; Metarril M103 - 15 g/montículo – via líquida; 6) Boveril® B102 (*B. bassiana*) - 10 g/montículo – polvilhamento; Boveril® B102 - 10 g/montículo – via líquida; Boveril® B102 - 15 g/montículo – polvilhamento e Boveril® B102 - 15 g/montículo – via líquida. Os resultados demonstraram que a aplicação via pó (dosagem de 10 g) dos fungos proporcionou maior mortalidade dos cupins nos cupinzeiros de pequeno porte, onde *B. bassiana* (Boveril) a 10g causou mortalidade de 80% sobre *C. cumulans*, após 30 dias da aplicação.

De acordo com Lopes et al. (2011), a produção de conídios é um fator importante na disseminação e permanência dos fungos entomopatogênicos nas populações de insetos, em especial nos cupins, devido ao contato social que permite a transferência do inóculo, de cupins infectados para os não-infectados além de aumentar o potencial do inóculo no ambiente do hospedeiro, o que é essencial para que esses patógenos sejam bons biocontroladores de insetos-praga.

3.5.3 *Isaria*: classificação atual e aspectos biológicos

Paecilomyces foi identificado em 1907 por Bainer, que observou sua estreita relação com o gênero *Penicillium*, diferindo na ausência de colônias com coloração verde e pelas fiálides cilíndricas curtas (SAMSON, 1974). Harting (1846) agrupou espécies similares a *Paecilomyces* no gênero *Spicaria*. Posteriormente, Hughes (1951) e Brown e Smith (1957) (*apud* SAMSON, 1974) propuseram a extinção de *Spicaria* e a transferência das várias espécies que o constituíram para o gênero *Paecilomyces*. Estes autores reconheceram a presença de estruturas conidiogênicas similares às encontradas na espécie tipo, *Paecilomyces variotii* (Bainier), em algumas espécies descritas em *Isaria* e *Spicaria*, e as transferiram para *Paecilomyces*. Um exemplo é a espécie *I. farinosa*, que foi considerada como lectótipo de *Isaria* por Clements e Shear (1931), Mains (1955) e Morris (1963) (*apud* SAMSON, 1974).

Hogde et al. (2005) estudaram a nomenclatura e história do gênero *Isaria*, enquanto Gams et al. (2005) propuseram conservar o nome do gênero. Luangsa-Ard et al. (2005) mostraram por meio da análise de sequência de β -tubulina parcial de 34 linhagens e de sequências de DNAr ITS-5.8S-ITS2 de 37 das linhagens de *Paecilomyces*, que a seção Isorioideae não é monofilética e que não há um grupo monofilético para todas as espécies associadas a invertebrados. Porém, uma clade foi criada, que incluiu as espécies entomopatogênicas pertencentes ao gênero *Isaria*. Estes autores analisaram as espécies *Paecilomyces amoeneroseus* (Hennings) Samson, *P. cateniannulatus* Liang,

P. catenobliquus Liang, *P. cicadae* (Miq.) Samson, *P. coleopterorus* Samson & H.C. Evans, *P. farinosus* (Holm ex. S.F. Gray) Brown & Smith, *P. ghanensis* Samson & H. C. Evans, *P. fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith, *P. javanicus* (Friedrichs & Bally) A.H.S. Br. & G. Sm. e *P. tenuipes* (Peck) Samson e as reclassificaram como *Isaria* e suas nomenclaturas foram modificadas para *I. amoenerosea* (Hennings)., *I. cateniannulata* (Z.Q. Liang) Samson & Hywel-Jones, *I. catenobliqua* (Z.Q. Liang) Samson & Hywel-Jones, *I. cicadae* Miquel, *I. coleopterora* (Samson & H. C. Evans) Samson & Hywel-Jones, *I. farinosa*, *I. ghanensis* (Samson & H. C. Evans) Samson & Hywel-Jones, *I. fumosorosea*, *I. javanica* e *I. tenuipes* (Peck) Samson. Enquanto as espécies *Paecilomyces suffultus* (Petch) Samson, *P. marquandii* (Massee) S. Hughes, *P. cinnamomeus* (Petch) Samson & W. Gams, *P. viridis* Segretain, Fromentin, Destombes, Brygoo & Dodin, *P. niphetodes* Samson , *P. sulphurellus* (Sacc.) Samson & W. Gams, *P. inflatus* (Burnside) J.W. Carmich., *P. carneus* (Duche et Heim) Brown et Smith, *P. penicillatus* (Duche et Heim) Brown et Smith e *P. lilacinus* (Thom.) Samson, remanescentes de *Paecilomyces* e colocadas na seção Isarioidea, permanecem no gênero *Paecilomyces*, pois há necessidade de mais estudos para determinar a verdadeira relação entre essas espécies e os outros anamorfos de Clavicipitacea.

No Brasil, as espécies entomopatogênicas do gênero *Isaria* que se destacam são: *I. farinosa*, *I. tenuipe*, *I. cicadidae* *I. fumosorosea* e *I. amoenorosea*. Esses fungos causam muscardina amarela em insetos e atacam também nematóides parasitas de plantas. Na Região Sudeste do Brasil, é comum a ocorrência desse gênero, causando epizootia em populações da lagarta do coqueiro, *Brassolis sophorae* L., sendo também isolados dos insetos: *Stenoma decora* Zeller, *Eupseudosoma* spp. e *Lagriia vilosa* Fabricius. De acordo com a espécie e o meio de cultivo, a colônia fúngica pode apresentar coloração esbranquiçada, amarela, rósea ou avermelhada. Durante o ciclo biológico, estas espécies apresentam conidióforos simples ou agrupados formando sinêmio. Os conídios podem ser elípticos a fusiformes, unicelulares, hialinos ou pigmentados. Formam apressórios, estruturas utilizadas para penetração no tegumento do inseto hospedeiro (ALVES, 1998).

3.5.3.1 Espécies de *Isaria*: características e importância no controle biológico

- *Isaria farinosa*

Isaria farinosa é um fungo encontrado em regiões tropicais, sendo sapróbio de solos florestais e parasita de várias espécies de insetos. De distribuição cosmopolita, tem sido assinalado em países como Brasil, Estados Unidos, Japão, África do Sul, dentre outros. Este fungo apresenta aspecto cotonoso, de coloração esbranquiçada a creme (Figura 6), com ótimo crescimento e esporulação a 25°C, *in vitro* (SAMSON, 1974; DOMSCH et al., 2007).

Os conidióforos (100-300 x 1,0-2,5 µm) são estruturas de parede lisa e hialina, formados por ramos verticilados com duas a quatro fiálides (5-15 x 1,2-2,5 µm) que possuem porção basal intumescida, terminando em um distinto pescoço alongado. Os conídios (2,0-3,0 x 1,0-1,8 µm) são elipsóides a fusiformes, às vezes em forma de limão, sendo a parede lisa e hialina (Figura 7). Forma apressório e não produz clamidósporo (SAMSON, 1974).

Isaria farinosa parasita várias espécies de insetos, sendo isolado de larvas de Lepidoptera, pupas de Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, pupário de Hemiptera e Arachnida. Essa espécie coloniza o inseto hospedeiro, do qual se originam numerosos conidióforos com conídios ou surgem sinêmios em toda parte do corpo do inseto. Devido à diversidade de hospedeiros, esse fungo vem sendo testado no controle de vários insetos-praga, como *Leptinotarsa decemlineata* (Say) e *Pyrausta nubilalis* (Hubn) (SAMSON, 1974; SAMSON et al., 1988; ALVES, 1998; DOMSCH et al., 2007).

Doberski (1981) analisou a patogenicidade de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. farinosa* contra o besouro *Scolytus scolytus* (Fabricius) e verificou que todos os isolados testados com suspensões de 1×10^3 e 1×10^4 conídios/mL foram patogênicos às larvas do inseto. *I. farinosa* foi moderadamente patogênico à larva, *B. bassiana* foi o mais patogênico e *M. anisopliae* foi o menos patogênico. Hayden et al. (1992) testaram a virulência de *I. farinosa* contra *Sitobion avenae* (Fabricius), antes e após o subcultivo do fungo, em passagem pelo hospedeiro e em meio contendo a cutícula do inseto. Antes do subcultivo, *I. farinosa* apresentou TL_{50} de 11 dias. Após três subcultivos, em ambos os substratos, *I. farinosa* diminuiu a TL_{50} para cinco dias, resultando, assim, na ativação da virulência perdida pelo fungo, quando cultivado *in vitro*.

A eficiência de *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Saccardo) Petch, *M. anisopliae*, *I. farinosa*, *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas e *Tolypocladium cylindrosporum* Gams, no controle da *Musca domestica* L., foi avaliada em condições de laboratório, por Barson et al. (1994). As fêmeas adultas foram suscetíveis a todos os fungos, quando inoculadas com suspensões de 1×10^3 a 1×10^5 conídios/mL. *I. farinosa* foi significativamente patogênico a *M. domestica*, na suspensão 1×10^5 conídios/mL, causando 100% de mortalidade aos nove dias de inoculação.

Prenerová (1994) analisou a patogenicidade de *I. farinosa* e o efeito da passagem *in vivo*, na viabilidade e virulência das linhagens sobre as larvas da mosca *Cephalcia abietis* L. As larvas foram inoculadas com suspensões de 5×10^7 conídios/mL e incubadas em câmara úmida a 22°C. As 16 linhagens apresentaram diferença significativa na viabilidade e virulência dos conídios contra *C. abietis*, expressa em valores de TL_{95} . As larvas foram mais suscetíveis a *I. farinosa* CCEF 2194 e *I. farinosa* CCFE 2202, após reisolamento de *C. abietis*.

Prenerová (1995) desenvolveu um novo método para a germinação dos blastosporos de *I.*

farinosa por meio do processo de aeração em meio líquido contendo 2% de peptona a 15°C e, em seguida, testou a virulência dos blastosporos germinados e não germinados sobre os ovos de *C. abietis*. Estes foram suscetíveis a *I. farinosa*, variando o percentual de mortalidade de acordo com a concentração e o nível de germinação dos blastosporos. Foram constatadas diferenças significativas nos valores de TL₉₅ para os esporos germinados e não germinados, sendo que após a aplicação com os esporos germinados, a infecção foi iniciada um ou dois dias mais cedo que os não germinados. Portanto, os blastosporos germinados foram capazes de destruir os ovos de *C. abietis* antes que as larvas emergissem, as quais são mais resistentes ao fungo, fornecendo assim informações essenciais para o manejo de aplicações no campo de *I. farinosa* no controle de *C. abietis*.

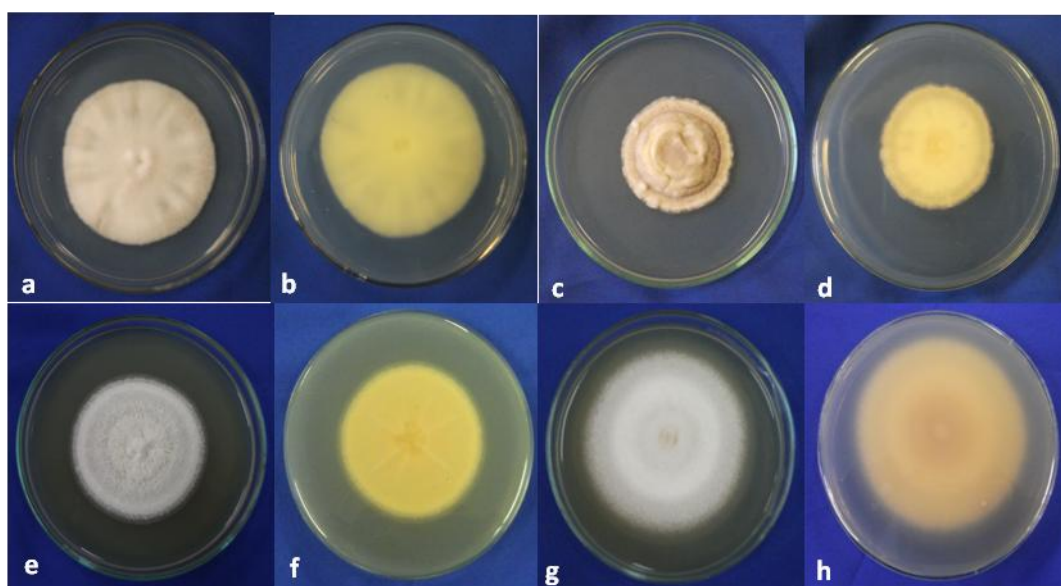


Figura 6. Aspecto do verso e reverso da colônia das linhagens *Isaria farinosa* ESALQ1205 (a; b), *I. farinosa* ESALQ1355 (c; d), *I. farinosa* URM5016 (e; f) e *I. farinosa* URM5060 (g; h) após 12 dias de crescimento em SAB a 26 °C. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

Estudos realizados por Wraight et al. (1998) avaliaram a patogenicidade de *B. bassiana*, *I. fumosorosea* e de *I. farinosa* contra ninfas de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. Verificaram que os isolados de *I. fumosorosea* e *B. bassiana* de diversas origens foram altamente patogênicos e apresentaram valores de CL₅₀ que variaram entre 50 e 150 conídios/mm². Todos os isolados de *I. farinosa* foram patogênicos, com CL₅₀ entre 350 e 4000 conídios/mm². Estes resultados comprovam a alta virulência de *Isaria* spp. e de *B. bassiana* contra o inseto, importante requisito para seleção de isolados a serem utilizados em programas de controle biológico.

Sanchez-Peña (2000) estudou a ocorrência de inimigos naturais de pragas agrícolas, nas

áreas desérticas das cidades de Saltillo e San Antonio de las Alazanas, no México. Os insetos foram coletados de culturas específicas estabelecidas em cada área e os patógenos isolados foram identificados. Entre estes se destacaram os fungos entomopatogênicos, devido à maior proporção nas amostras e à importância das espécies encontradas. *I. farinosa* foi isolado de espécimes do inseto *Crocidema* sp. (Coleoptera: Curculionidae), praga presente nos pomares de maçã, em San Antonio de las Alazanas. As condições favoráveis das áreas estudadas podem promover a permanência e a diversidade destes patógenos, favorecendo assim, futuras pesquisas sobre o controle biológico de insetos-praga da região, com o uso de linhagens fúngicas selvagens ou introduzidas por programas de manejo de pragas.

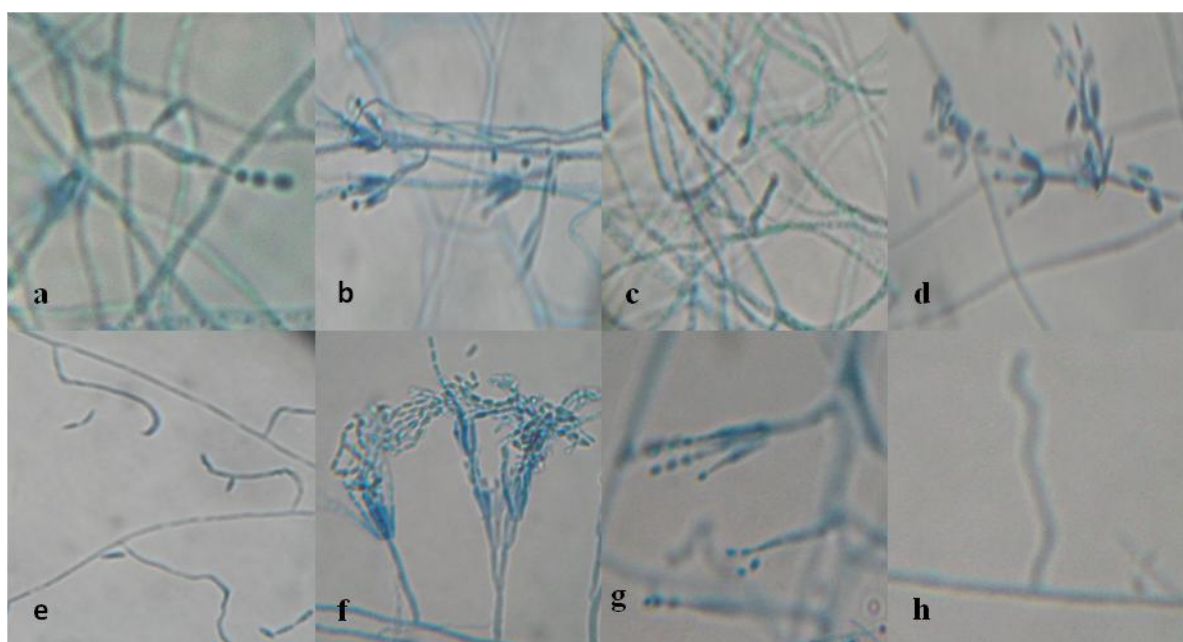


Figura 7. Microestruturas das linhagens de *Isaria farinosa* após 96 horas de cultivo em SAB. Conidióforo simples e conídios catenulados (a), conidióforos verticilados (b) e apressórios simples (c) de *Isaria farinosa* ESALQ1205; conidióforos verticilados e conídios (d) e apressórios simples (e) de *I. farinosa* ESALQ1355; conidióforos verticilados e conídios catenulados (f) de *I. farinosa* URM5016, conidióforos e conídios catenulados (g) e apressório simples (h) de *I. farinosa* URM5060. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

A virulência dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas, e *I. farinosa* foi avaliada contra adultos da praga de grãos armazenados, *Sitophilus orizae* L. (DAL-BELLO et al., 2001). Os autores verificaram que todas as linhagens testadas causaram mortalidade, havendo, no entanto, grande variação em relação à virulência dos fungos ao inseto. As linhagens mais eficientes foram: *I. farinosa* ARSEF2937, *M. anisopliae* ARSEF2974 e *B. bassiana*

ARSEF5500, que causaram mortalidade de 30%, 40% e 50%, respectivamente, após 14 dias de inoculação. Em seguida, testaram a mistura de *M. anisopliae* ARSEF2974 e *B. bassiana* ARSEF5500 associados ou não ao inseticida Fenitrothion contra *S. orizae* contidos em arroz e evidenciaram que 80% dos insetos morreram após 14 dias. Os resultados indicaram que o controle biológico pela utilização de fungos entomopatogênicos associados ou não a inseticidas químicos pode ser um método viável para o controle de insetos que danificam grãos estocados e causam prejuízos econômicos para a agricultura.

A ocorrência de fungos entomopatogênicos em solos agrícolas na Palestina foi estudada por Ali-Shtayeh et al. (2002). Os fungos foram coletados em 33,6% das amostras de solo estudadas, com total de 70 isolados pertencentes a 20 espécies de 13 gêneros, entre estas, *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batco, *Absidia cylindrospora* Hagem, *Fusarium solani* (Martius) Saccardo, *F. oxysporum* Schlechtendahl, *I. farinosa*, entre outros. Os autores também avaliaram a patogenicidade dos isolados sobre as larvas da lagarta *Galleria mellonella* L. Todas as espécies foram virulentas às larvas de *G. mellonella*, sendo que a média de patogenicidade variou entre 16 e 100%.

Lopes-Llorca et al. (2002) avaliaram o potencial de extratos enzimáticos de *I. farinosa*, isolado do lepidóptero *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller) às larvas de *G. mellonella*. Os autores observaram que as proteases degradaram e também induziram a liberação de proteínas da cutícula do inseto, após uma hora de exposição aos extratos enzimáticos. Estes resultados indicaram que estas enzimas proteolíticas estão envolvidas no processo de penetração da cutícula do inseto hospedeiro por *I. farinosa*, sendo um importante fator para o sucesso deste fungo no controle biológico de insetos-praga.

Ropek e Para (2003) testaram o efeito de íons dos metais pesados (Pb, Cd, Cu, Zn e Ni), isolados ou associados aos complexos amino-aldeídico sobre patogenicidade de *I. farinosa* a *G. mellonella*. O fungo foi inoculado em BDA contendo iguais concentrações dos íons metálicos e dos complexos de substâncias. Após 12 dias foram feitas suspensões, que foram utilizadas para infectar o inseto. Quando utilizados separadamente, os íons Cd e Pb afetaram a patogenicidade, pois o fungo causou mortalidade de 60 e 80% respectivamente, após 10 dias de inoculação. Os complexos (DHZ, DTSC e DOX) reduziram significativamente o efeito tóxico dos íons Cd e Pb, aumentando o percentual de mortalidade de *I. farinosa*, enquanto os demais íons mostraram mínima influência sobre o fungo, causando 80 a 100% de mortalidade ao inseto. Ainda, os complexos amino-aldeídicos não afetaram a patogenicidade de *I. farinosa*, onde foi evidenciado 100% de mortalidade das lagartas nos períodos observados.

Foram feitas pesquisas em áreas agrícolas na Ásia com o objetivo de identificar os fungos entomopatogênicos à praga do trigo, *Eurygaster integriceps* Puton em diferentes fases do ciclo de vida. Dos insetos coletados, foram isolados 221 espécimes dos gêneros *Beauveria*, *Verticillium* e

Isaria. Entre estes, cerca 25% era *I. farinosa*. Em seguida, a patogenicidade de *B. bassiana*, *I. farinosa* e *V. lecanii* foi avaliada contra *E. integriceps*. O inseto foi suscetível aos fungos, sendo que *B. bassiana* 6022 e *I. farinosa* 6020 causaram mortalidade de 93% e 66,2% respectivamente, após 15 dias. Estes resultados demonstram potencial dos fungos entomopatogênicos para controle no campo de *E. integriceps* (PARKER et al., 2003).

A ação de *P. lilacinus* e *I. farinosa* sobre teleóginas do carrapato bovino, *Boophilus microplus* (Canestrini) foi avaliada *in vitro*. As fêmeas ingurgitadas foram tratadas com diferentes suspensões de conídios e mantidas à temperatura ambiente. Os fungos causaram alterações nos seguintes parâmetros biológicos: peso inicial e residual da fêmea, peso da massa de ovos, índice de produção de ovos, período de eclosão, período de pré-postura, período de postura, período de incubação, período de eclosão e eficiência reprodutiva. Estes resultados demonstram o potencial de *I. farinosa* e *P. lilacinus* no controle de *B. microplus*, pois foram capazes de diminuir ou aumentar as etapas do ciclo reprodutivo desta praga, podendo afetar o aparecimento de novas gerações (SANTOS, 2003).

Loureiro e Monteiro (2004) avaliaram a patogenicidade dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. farinosa* contra operárias de *Atta sexdens sexdens* (L.), em laboratório. As operárias foram banhadas em suspensões de 1×10^6 a 1×10^9 conídios/mL e mantidas em câmara úmida, a 27°C. *I. farinosa* foi o mais patogênico das espécies testadas, em todas as suspensões, apresentando mortalidade de 96%, após o 3º dia, quando inoculado com a concentração 1×10^9 conídios/mL.

Espécies de *Isaria*, patogênicas a insetos, têm sido excelentes produtoras de metabólitos bioativos, de importância industrial, como Paecilosetin, produzido por *I. farinosa* CAUTE108, na Nova Zelândia. Este metabólito, quando testado contra *Bacillus subtilis* Cohn, *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries e *Trichophyton mentagrophytes* Blanchart mostrou ação antagonista, pois inibiu consideravelmente o crescimento destes microrganismos, podendo ser posteriormente analisado e utilizado no biocontrole de outros microrganismos prejudiciais ao homem (LANG et al., 2005).

A patogenicidade dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. farinosa* foi testada contra a casta de soldado de *A. sexdens sexdens*. Os soldados foram inoculados com suspensões de 1×10^6 a 1×10^9 conídios/mL e mantidos a 27°C. Os três fungos foram eficientes patógenos, matando mais que 80% dos soldados nos períodos analisados. *B. bassiana* JAB06, *M. anisopliae* AL e *I. farinosa* G198 mostraram maior capacidade de esporular sobre os cadáveres do inseto, sendo esta característica importante no sucesso da disseminação dos fungos entre os insetos sociais, devido à interdependência entre as castas (LOUREIRO e MONTEIRO, 2005).

Dubois et al. (2008) avaliaram vinte amostras de fungos entomopatogênicos hypocreales (*B. bassiana*, *B. brongniartii*, *I. farinosa* e *M. anisopliae*) sobre adultos do besouro *Anoplophora*

glabripennis (Motschulsky). Os autores constataram variação no tempo de sobrevivência (TS₅₀) dos fungos, uma vez que *M. anisopliae* ARSEF6827 e *B. brongniartii* ARSEF7234 apresentaram tempo de sobrevivência de cinco dias, enquanto a TS₅₀ de *I. farinosa* ARSEF 8411 foi de 2,45 dias.

Yang et al. (2009) avaliaram a ação inseticida de *I. farinosa* sobre as larvas, pupas e adultos de *Pissodes punctatus* Langor & Zhang nas concentrações de 1x10³ a 1x10⁸ conídios/mL, sendo determinada a média de mortalidade e os valores da CL₅₀. O fungo foi eficiente no controle do inseto, com mortalidade proporcional ao aumento das concentrações testadas. As larvas foram mais susceptíveis ao fungo, pois este matou 91,25% das larvas, na concentração 1x10⁸ conídios/mL após 15 dias, com a CL₅₀ de 1,2x 10⁶ conídios/mL, enquanto as pupas e os adultos apresentaram mortalidade e CL₅₀ de 88,83 e 89,17%, 1,72 e 1,99 x 10⁶ conídios/mL, respectivamente.

Foi investigada a diversidade de patógenos de besouros (Curculionidae: Scolytinae) associados com espécies de diferentes árvores, na Bulgária (TAKOV et al., 2012). Os autores analisaram 818 espécimes pertencentes a 22 espécies de besouro, sendo que os patógenos ocorreram em nove espécies de hospedeiros. Estes foram encontrados no intestino e na hemolinfa dos insetos infectados, sendo identificados como: vírus ItEPV Weiser & Wegensteiner, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *I. farinosa*, *Gregarina typographi* Fuchs, *Gregarina spp.*, *Chytridiopsis typographi* Weiser, *Chytridiopsis sp.*, e nemátodos. Foi o primeiro relato do fungo *B. bassiana* isolado de *Tomicus piniperda* L., *Orthotomicus longicollis* Gyllenhal, *O. erosus* (Wollaston), *Taphrorychus villifrons* Wood & Bright e *Phylobius sp.* na Bulgária. Também os primeiros registros das espécies de *Gregarina* sobre *O. longicollis*, *Acanthocinus aedilis* L., *Rhagium inquisitor* L., *Pyrochroa coccinea* L. e o *Chytridiopsis sp.* isolado de *O. longicollis*.

- *Isaria javanica*

Isaria javanica é um entomopatógeno testado no controle de insetos. De acordo com Samson (1974), após a morte de insetos-praga por *I. javanica* há a formação do micélio cotonoso de cor branca, com numerosos conidióforos formados por fiálides globosas, sobre os cadáveres dos insetos (Figura 8). A conidiogênese de *I. javanica* em meio de cultura difere da produção de conídios em substrato natural, sendo as estruturas mais complexas. Esse patógeno apresenta colônia de aspecto flocoso a cotonoso e de cor branca a creme (cultura envelhecida), podendo a colônia atingir o diâmetro de três cm, após 14 dias, a 25°C (Figura 9).

Essa espécie apresenta hifas septadas, hialinas, com 0,5-2,2 µm de largura e os conidióforos eretos são originados das hifas aéreas, com até 50 µm de comprimento e 1,5-2,5 µm de diâmetro, ou fiálides solitárias diretamente sobre as hifas. Os conidióforos são formados por ramos verticilados com 2-3 fiálides. Estas são constituídas por uma porção basal cilíndrica, que termina em um

pescoço fino e distinto (2,0-4,5 μm de comprimento e 0,7-1,4 μm de diâmetro). Os conídios são cilíndricos a fusiformes, de parede lisa e hialina (5-7,4 x 1,4-1,7 μm) (Figura 10). A espécie não produz clamidósporos (SAMSON, 1974).



Figura 8. Operários de *Coptotermes gestroi* colonizados por *Isaria javanica* URM4995 (a) e *Isaria javanica* URM4993 (b). Fonte: Lopes et al. (2011) .

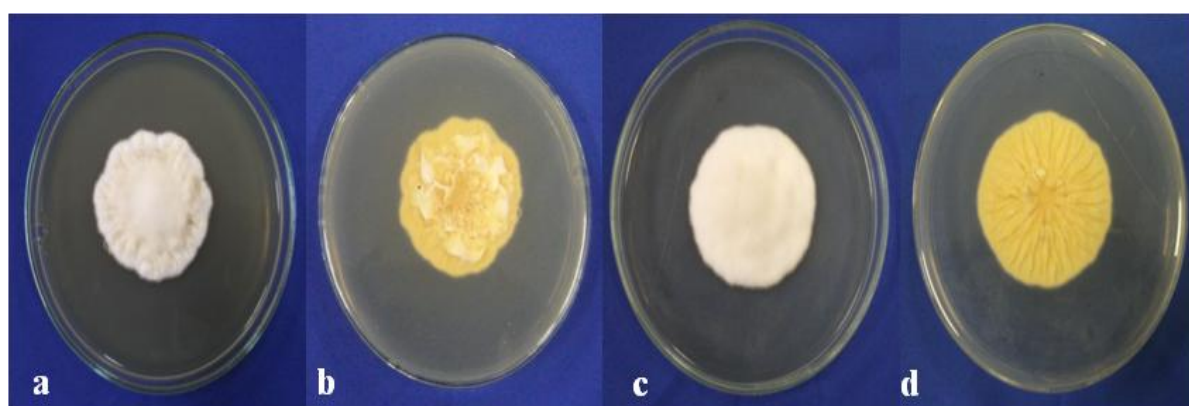


Figura 9. Aspecto do verso e do reverso da colônia das linhagens *Isaria javanica* URM4993 (a; b) e *I. javanica* URM4995 (c; d). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

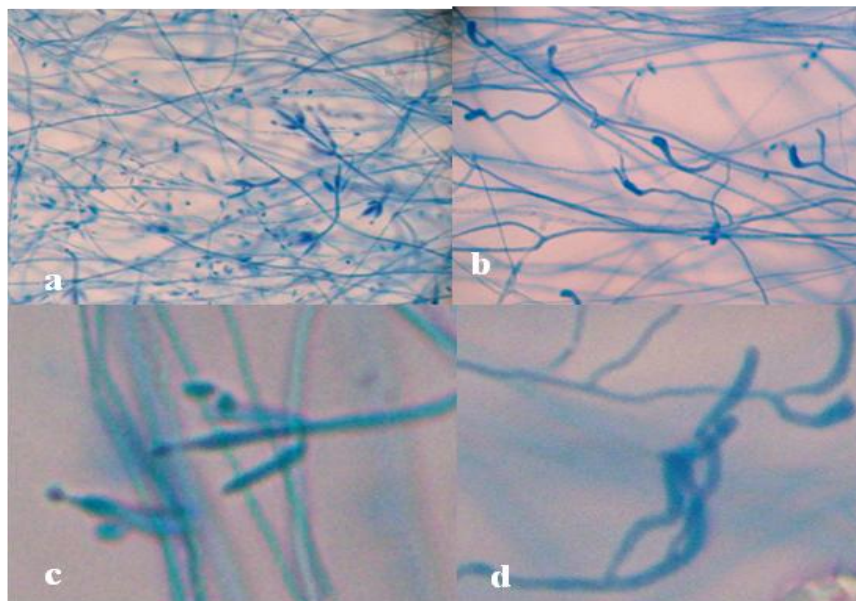


Figura 10. Microestruturas das linhagens de *Isaria javanica* após 96 horas de cultivo em SAB. Conidióforos verticilados e conídios catenulados (a) e apressórios simples e bifurcados (b) de *Isaria javanica* URM4993; conidióforos verticilados e conídios (c) e apressórios bifurcados (d) de *Isaria javanica* URM4995. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

Wright et al. (2003) patentearam linhagens das espécies *I. javanica* e *I. fumosorosea* para o controle de cupins subterrâneos. Essas produzem grande quantidade de inóculo (conídios e blastosporos) em meios sólidos, fáceis e baratos de serem preparados. Também não são repelentes, sendo facilmente disseminadas entre os indivíduos da colônia, causando rápida mortalidade. *I. javanica* ARSE7322 e *I. fumosorosea* ARSE73581 foram mais eficientes no controle dos cupins *R. flavipes* e *C. formosanus*, sendo também eficazes na proteção de árvores, madeira, estruturas de madeira e outros materiais celulolíticos, contra infestações e danos causados pelos cupins.

Scorsetii et al. (2008) estudaram a incidência de fungos entomopatogênicos sobre *Bemisia tabaci* (Gennadius) e *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) em culturas de hortaliças orgânicas e convencionais, em Buenos Aires e na província de Corrientes, Argentina. Os autores isolaram os seguintes fungos dos insetos: *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams, *L. muscarium* (Petch) Zare & W. Gams, *L. longisporum* (Petch) Zare & W. Gams, *I. fumosorosea* e *I. javanica*.

Em seguida, foi testada a patogenicidade dos fungos contra ninfas de *T. vaporariorum*, sendo obtida a taxa de mortalidade das ninfas variando entre 26,6% e 76,6%, aos sete dias pós-infecção. Estes são os primeiros registros de infecção natural de *L. lecanii*, *L. muscarium*, *L. longisporum* e *I. javanica* em *T. vaporariorum* e de *I. fumosorosea* sobre *B. tabaci*, na América d Sul.

Specht et al. (2009) registraram a primeira ocorrência de *I. javanica* sobre *Lomonia obliqua* Walker. O fungo foi isolado de lagartas de uma agregação em Plátano - *Platanus acerifolia* (Aiton) Wild, em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, e foi caracterizado por meio da Taxonomia Clássica (morfologia das hifas, conídios e fiálides) e pela análise molecular, com sequenciamento. Em seguida, os autores testaram a patogenicidade do fungo pela técnica de Kock, onde inocularam 9 mL de uma suspensão de $5,2 \times 10^7$ conídios/mL em lagartas de *L. obliqua*, sendo que todas morreram até o sétimo dia de tratamento. O fungo reisolado foi confrontado por meio do sequenciamento com a cultura isolada, confirmando ser a mesma espécie, bem como a sua capacidade de infectar o inseto. A sequência do DNA do fungo foi depositada no GenBank, sob o código de acesso Fj750877.

Cabanilhas e Jones (2009) estudaram a ação de *Isaria* sp. isolado de *Bemisia tabaci* (Gennadius) em plantação de batata, no Texas, em laboratório. Os autores constataram a eficiência do fungo nas concentrações de 20, 200 e 1000 conídios/mm² sobre as ninfas de segundo, terceiro e quarto ínstares, respectivamente, sendo que a concentração média letal (CL₅₀) para as ninfas de segundo e terceiro ínstares foi similar, e foram mais susceptíveis que as ninfas do quarto ínstar. O tempo médio letal (TL₅₀) foi menor para as ninfas de segundo ínstar. O fungo atrasou o processo de infestação do inseto sobre a cultura da batata, sendo este um agente promissor a ser usado no controle de *B. tabaci*.

Estudos foram realizados por Lopes et al. (2011) para avaliar a eficiência de linhagens de *I. javanica* sobre operários de *C. gestroi*, bem como os aspectos biológicos (germinação e esporulação) do entomopatógeno após a infecção sobre o cupim e a produção de conídios sobre os insetos mortos. O fungo foi eficiente no controle dos operários, em laboratório, com percentual de mortalidade acumulada de 100% após o 6º dia do tratamento. As linhagens reisoladas apresentaram maior percentual de germinação e de esporulação dos conídios quando comparadas com as mesmas culturas não reisoladas. Ainda, as linhagens apresentaram ótimo potencial de produção de conídios sobre os operários infectados. Esses resultados indicam o fungo como um candidato ao controle biológico desse cupim.

Hasan et al. (2012) pesquisaram a presença de fungos entomopatogênicos e oportunistas em amostras de solo coletadas em sítios de hibernação de insetos, em vários habitats do Curdistão, Iraque. Foram isoladas e identificadas duas espécies entomopatogênicas, *B. bassiana* e *I. javanica*, com percentual de 38,46% cada, do total de amostras isoladas. Os fungos oportunistas *Alternaria*

alternata (Fr.: Fr.) Kessl, *Aspergillus flavus* Link, *A. niger* Van Tieghen, *Penicillium glabrum* (Wehmer) Wehmer, *P. digitatum* (Pers.) Sacc. *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. e *Syncephalastrum racemosum* Schroter foram também isolados e apresentaram taxas de isolamento entre 7,67% a 30,77%. Em seguida, os autores testaram a patogenicidade das espécies fúngicas sobre os pulgões *Hyalopterus pruni* Geoff e *Aphis pomi* (DeGreer), sendo que *B. bassiana* foi mais eficiente, causando 100% de mortalidade dos insetos, após seis dias, seguido por *I. javanica*, com taxa de mortalidade de 66,67% e 75,59% sobre os insetos, respectivamente.

- *Isaria fumosorosea*

O fungo *I. fumosorosea* é um parasita de insetos com uma variedade de hospedeiros e de distribuição mundial, ocorrendo da Europa a África e Ásia. Este patógeno também foi encontrado nos solos florestais de países como Holanda, Alemanha, Canadá e Brasil. Também foi isolado de ninhos de aves e de tecidos de pulmão de tartarugas gigantes. Essa espécie tem sido usada no controle biológico de insetos, e também produz a beauvericina, toxina que atua no organismo do hospedeiro (DOMSCH et al., 2007).

O fungo cresce moderadamente, atingindo colônias com diâmetro de quatro cm em 14 dias, a 25 °C, com aspecto flocoso ou puerulento, de coloração variando de esbranquiçada, em culturas novas, a tons de rosa, especialmente quando produz conídios em abundância (Figura 11 a,c). O reverso da colônia é incolor ou amarelo, sem odor (Figura 11b, d). Forma hifas vegetativas de paredes lisas e hialinas, de 1,5-3,5 µm de largura (SAMSON, 1974).

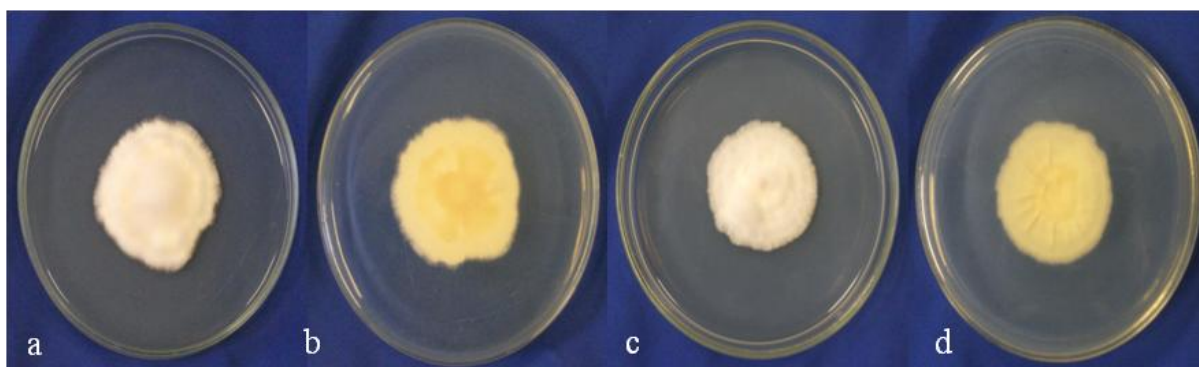


Figura 11. Aspecto do verso e do reverso da colônia das linhagens *Isaria fumosorosea* ESALQ1296 (a; b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297 (c, d). Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

As estruturas conidiogênicas consistem de conidióforos eretos, originados de hifas aéreas ou

submersas, formando uma estrutura complexa. Os conidióforos medem até 100 µm de comprimento e 1,5-2,0 µm de largura, com paredes lisas e hialinas, consistindo de ramos verticilados, dispostos lateralmente na hifa, formando uma estrutura complexa (5,7-8x1-2 µm). Os conidióforos são formados por duas a cinco fiálides, com uma porção basal globosa ou elipsoide que termina em um longo pescoço distinto, os quais produzem conídios cilíndricos alongados (3-4x1-2 µm) (Figura 12 a, c). A espécie forma apressórios (Figura 12 b e d) e não produz clamidosporos (SAMSON, 1974 DOMSCH et al., 2007).

Linhagens da espécie vêm sendo estudadas no controle de insetos. Meyer et al. (2008) isolaram um fungo entomopatogênico de adultos infectados de *Diaphorina citri* Kuwayama em citros na Flórida/USA. O isolado foi identificado e classificado por meio das características morfológicas e genéticas como *I. fumosorosea*. Os autores realizaram os Postulados de Kock com o fungo reisolado de *D. citri*, sendo que os insetos tratados com esse fungo apresentaram as mesmas características fenotíficas dos insetos infectados encontrados nos pomares da Flórida.

A baixa tolerância dos fungos entomopatogênicos a temperaturas elevadas é um grave fator para um período longo de estocagem dos mesmos, podendo interferir na eficiência do controle de pragas em altas temperaturas. Nesse sentido, Kim et al. (2010) avaliaram o efeito das altas temperaturas sobre a viabilidade, bem como a produção de conídios de *I. fumosorosea* SFP-198 em diferentes substratos. Esses autores constataram que o substrato à base de milho, acrescido do óleo de milho, foi mais eficiente para o crescimento da linhagem, além de ajudar na germinação dos conídios em altas temperaturas, havendo uma redução de apenas 7% da taxa de germinação quando comparado com o tratamento com o meio à base de milho, que reduziu a germinação em 67%.

O fungo *I. fumosorosea* isolado do adulto de *D. citri* em pomares de citrus, na Flórida, foi avaliado no controle *in vitro* do inseto. Esses foram tratados com as concentrações de 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL, sendo obtidos os tempos letais (TL₅₀) de 111 e 102,5 horas, respectivamente, e o valor de CL₅₀ foi $6,8 \times 10^5$ conídios/mL. Os autores também testaram a ação do fungo sobre *D. citri* em pomares de citrus, para confirmar a infecção pelo patógeno em campo, e constataram que as ninfas foram infectadas a partir da concentração de 1×10^7 conídios/mL (HOY et al., 2010).

Mascarin et al. (2010) investigaram a produção dos fungos *I. fumosorosea* e *I. farinosa* em fermentação bifásica, usando resíduos e produtos agroindustriais, visando à avaliação da associação destes produtos ao Meio Completo (MC) e ao meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) no crescimento dos fungos. Os melhores meios líquidos foram o melaço de cana-de-açúcar + caldo de arroz, caldo de arroz + extrato de levedura + melaço de cana-de-açúcar, os quais proporcionaram maior concentração de propágulos viáveis, sendo que o meio de caldo de arroz com melaço de cana-de-açúcar foi selecionado para produção dos fungos isolados. Já na fermentação em meio sólido, a melhor produção dos conídios foi alcançada com o farelo de soja e milho para *I. farinosa* e, de

arroz inteiro para *I. fumosorosea*. Assim, os fungos podem ser produzidos rapidamente, com maior produção de conídios sobre recursos agroindustriais, usando técnicas de fermentação bifásica.

Há várias espécies de insetos que danificam seriamente árvores de avelã e seus frutos na Turquia. Neste sentido, Sevim et al. (2010) isolaram e identificaram fungos entomopatogênicos em solo e também avaliaram a eficiência de sete isolados contra *Melolontha melolontha* L., uma das pragas mais sérias do avelã, sendo este o primeiro relato de isolamento de fungos entomopatogênicos encontrados no solo da Turquia. Estes foram encontrados em 20,59% das amostras de solo estudadas, sendo classificados com base na morfologia, na sequência ITS, no sequenciamento parcial do 18S (SSU rDNA) e nos genes EF1- α , como *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium* sp., *B. bassiana*, *Beauveria* cf. *bassiana*, *I. fumosorosea* e *Evlachovaea* sp. O fungo *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi o mais abundante e todos os isolados foram patogênicos a *M. melolontha*, podendo ser usados no controle do inseto.

Xu et al. (2011) avaliaram a bioatividade de *I. fumosorosea* e do composto secundário 20-hidroxiecdisona de *Acropyga nipponensis* Terayama contra *Plutella xylostella* L. O composto e o fungo causaram mortalidade significativa sobre as larvas do inseto e retardaram o tempo de emergência para fase adulta. Os autores também testaram o sinergismo de *I. fumosorosea* e de 20-hidroxiecdisona sobre as larvas, em laboratório e no campo, e constaram que o composto não causou influência negativa sobre a germinação, crescimento micelial e produção de conídios de *I. fumosorosea*. O percentual de mortalidade de *P. xylostella* após a aplicação de diferentes concentrações de 20-hidroxiecdisona e *I. fumosorosea* evidenciou que a mortalidade do inseto está diretamente relacionada à concentração de cada componente na solução e que o efeito cumulativo foi evidente com maior tempo de exposição.

Segundo Lacey et al. (2011), os fungos entomopatogênicos são um elemento vital para a estratégia de Manejo Integrado de insetos-praga das cultivares de batata. Os autores avaliaram a ação dos entomopatógenos *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e o inseticida Abamectina sobre o psíldeo da batata, *Bactericera cockerelli* (Sulc), em campo. Os fungos reduziram a produção de ovos e ninfas, enquanto apenas o inseticida reduziu significativamente os danos às plantas causados pelo inseto. Esses autores testaram também a associação dos fungos com o inseticida e o óleo de Nim sobre o *B. cockerelli* e verificaram a mortalidade de 78 e 84% dos insetos, respectivamente.

Lezama-Gutiérrez et al. (2012) relataram que a praga dos citros, *D. citri* é susceptível a fungos entomopatogênicos, pois verificaram a eficiência de linhagens de *M. anisopliae*, *Cordyceps bassiana* (fase teomorfa de *B. bassiana*) e *I. fumosorosea* sobre ninfas e adultos do inseto em campo. Os percentuais de mortalidade encontrados para ninfas por *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea* foram de 60%, 40% e 35%, e para adultos, de 50%, 42% e 22%, respectivamente. Os dados demonstraram que esses fungos são mais eficazes na redução da densidade das ninfas que dos

adultos de *D. citri*.

O conhecimento da ocorrência sobre a distribuição e diversidade de patógenos de insetos e aracnídeos no Ártico é muito limitado. O clima afeta as comunidades de artrópodes terrestres árticas, afetando também as interações patógeno-hospedeiro. Meyling et al. (2012) estudaram a presença de fungos entomopatogênicos em amostras de solo coletadas em quatro localidades na Groelândia. Fungos foram isolados de amostras de solo utilizando como iscas de larvas dos insetos *G. mellonella* e *Tenebrio molitor* L. Foram identificadas cinco espécies de fungos do Filo Ascomycota e Ordem Hypocreales: *I. fumosorosea*, *I. farinosa*, *B. bassiana*, *B. pseudobassiana* Rehner e Humber e *Tolypocladium inflatum* Gams W. (SYN. = *Tolypocladium niveum*). *I. farinosa* foi encontrado nas amostra das quatro localidades, enquanto *I. fumosorosea* foi detectado em amostras de três localidades, incluindo ambos os locais elevados do árticos. Os fungos patógenos de insetos são amplamente distribuídos no solo da Groenlândia, sendo estes incluídos em posteriores estudos sobre a ecologia de artrópodes no Ártico.

Nos últimos anos, o gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll) se tornou uma praga recorrente nas províncias do Norte da Argentina (PELIZZA et al., 2012). Os autores avaliaram a atividade da quitinase de 59 isolados de fungos entomopatogênicos nativos da Argentina, sendo determinada a relação entre a atividade enzimática e virulência desses entomopatógenos. *B. bassiana* LPSC1067 foi a linhagem mais eficiente no controle de *T. collaris*, pois matou 97,7% das ninfas, enquanto *I. farinosa* LPSC1071 causou mortalidade de 15,5% sobre as ninfas. Os fungos apresentaram atividade quitinolítica, porém com diferença dos halos de degradação da quitinase.

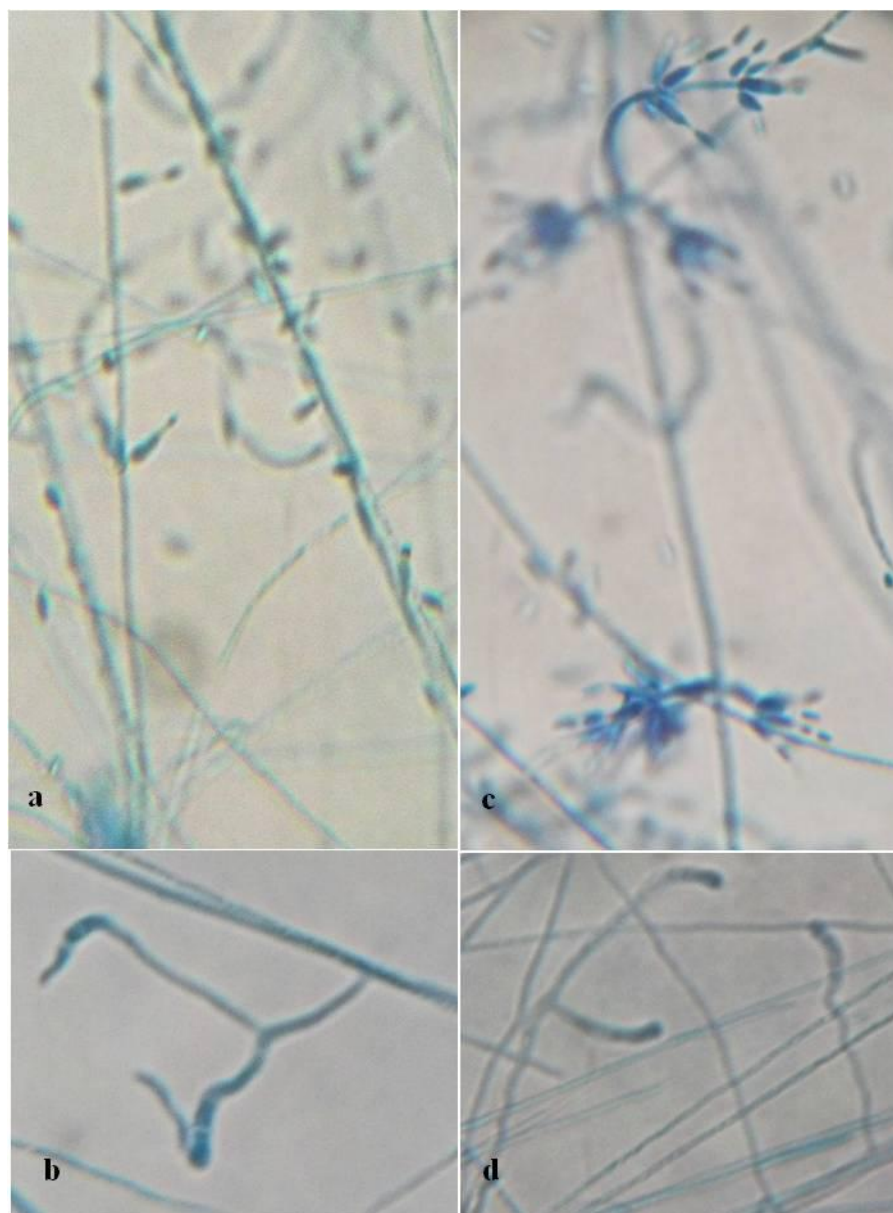


Figura 12. Microestruturas das linhagens de *Isaria fumosorosea* após 96 horas de cultivo em SAB. Conidióforos em ramos verticilados (a) e apressório bifurcado (b) de *Isaria fumosorosea* ESALQ1296; conidióforos em ramos verticilados (c) e apressórios. simples e bifurcado (d) de *Isaria fumosorosea* ESALQ1297. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

3.5.4 Uso de extratos vegetais no controle de insetos

Diversas espécies vegetais são testadas com sucesso no controle de insetos. Os vegetais são usados na medicina popular como agente antimicrobiano, antiinflamatório, hipoglicemiante, com potencial para uso biotecnológico industrial (LEITE et al., 2006; LEITE et al., 2007), e apresentam ação inseticida contra insetos-praga (SÁ et al., 2009).

Estudos relatam o efeito inseticida dos extratos de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em cerca de 400 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Diptera e de ácaros e nematóides (MARTINEZ, 2002). Essa planta é considerada uma das espécies mais difundidas no controle de insetos, devido a substâncias inseticidas presentes em suas folhas e em seus frutos (MEDINA et al., 2004). Dentre os mais de 40 terpenóides já identificados com ação inseticida, a azadiractina é o composto mais eficiente (SCHMUTTERER, 1995). Os compostos bioativos do Nim são usados na forma de pós, extratos aquosos e/ou orgânicos, óleos e pastas, além de frações parcialmente purificadas e formulações ricas em azadiractina (SAXENA, 1989). O Nim foi usado primeiramente contra pragas caseira e de armazenagem, sendo utilizado nas culturas de arroz e de cana-de-açúcar desde 1930, visando o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e de espécies de cupins (SAXENA, 1993). A eficiência do extrato dessa espécie é comprovada sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, o parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, as pupas das moscas *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), *Musca domestica* (L.) e a praga de milho armazenado *S. zeamais*, entre outros (GÓES et al., 2003; GONÇALVES-GERVÁSIO e VERDRAMIM, 2004; DELEITO e BORJA, 2008; SOUZA e TROVÃO, 2009).

O extrato aquoso do fruto de *Melia azedaracha* L. foi testado sobre ninfas de *B. argentifolli* na cultura do tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) por Sousa e Vendramim (2000), causando a mortalidade de 90% das ninfas do inseto.

Thomazini et al. (2000) analisaram os efeitos de extratos de folhas e de ramos (0,1 %, 1,0 % e 5,0 %) de *Trichilia pallida* Swartz sobre o desenvolvimento e oviposição de *Tuta absoluta* (Meyrick) (traça-do-tomateiro). Os extratos afetaram principalmente a fase larval do inseto, aumentando a duração e reduzindo a viabilidade desse período. Entretanto, o extrato de folhas teve maior atividade que o de ramos, pois reduziu em 20% a viabilidade larval, a partir da concentração de 1%. O extrato de folhas a 5% não apresentou efeito ovicida.

Torres et al. (2001) avaliaram os extratos aquosos de plantas sobre *Plutella xylostella* L. na cultura da couve (*Brassica oleraceae* L.). O extrato aquoso do fruto de cinamomo, *M. azedaracha* prolongou a fase larval de *P. xylostella*, enquanto a viabilidade pupal foi afetada em 100% e a

mortalidade larval foi de 96,7%. O extrato da amêndoa de *A. indica* causou a morte total das larvas, enquanto os extratos aquosos de folhas de salsa, *Ipomoea asarifolia* (Ders.) Roem. & Schult. O extrato aquoso de *Trichilia pallida* Swartz não causou variação na duração e viabilidade larval e pupal.

Tavares (2002) estudou o efeito inseticida de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre o inseto adulto de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), praga de grãos armazenados, mostrando que ele foi eficiente no controle do inseto.

Carvalho et al. (2003) testaram óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) no controle da larva do mosquito *A. aegypti*, observando que a menor concentração (0,017 %) desse produto causou mortalidade de 100 % das larvas, quando acrescido do alcalóide Thymol, que é o principal componente do óleo essencial de *L. sidoides*, responsável pela ação larvicida.

Cavalcante et al. (2006) avaliaram o potencial inseticida de extratos aquosos foliares de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC (algaroba), *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem. (aroeira), *Leucaena leucocephala* (leucena) e *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá) sobre *Bemisia tabaci* Gennadius (mosca-branca). Apenas os extratos de *P. juliflora* e *L. leucocephala* causaram mortalidade de 75 % de ninfas e a inviabilidade sobre de ovos. Esses extratos e o de *M. caesalpinifolia* afetaram a fertilidade do inseto, reduzindo a taxa de reprodução, o tempo médio de geração e a taxa intrínseca de crescimento por três gerações da mosca-branca.

Sausen et al. (2007) analisaram o efeito inseticida dos extratos aquosos do pó-de-fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e de DalNeem (produto à base de *A. indica*), nas concentrações de 5 % a 10 % sobre a joaninha *Eriopsis connexa* Germar. Os autores verificaram que a ingestão dos produtos vegetais ocasionou redução na oviposição de *E. connexa*, entretanto a eclosão das larvas não foi afetada por esses extratos.

Barbosa et al. (2007) testaram a ação inseticida de extratos de *Cyperus rotundus* L. (tiririca) sobre *Diabrotica speciosa* Germar e verificaram que esses foram mais eficientes em concentrações mais elevadas.

Segundo Lima et al. (2008), as plantas produzem variados compostos no seu metabolismo secundário, os quais estão relacionados com a interação da planta com o meio ambiente, agindo, por exemplo, na defesa contra insetos, bactérias e fungos. Os autores testaram o efeito do óleo essencial de frutos de *Ilicium verum* L. e de *Cymbopogon citratus* (DC) sobre o comportamento de *Brevicoryne brassicae* L. Esses óleos apresentaram efeito repelente para o pulgão nas concentrações de 0,5% e 0,1%, respectivamente.

Santiago et al. (2008) avaliaram os efeitos dos extratos aquosos de folhas e ramos de arruda (*Ruta graveolens* L.), folhas e ramos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), folhas de *L. sidoides* e fruto verde de mamona (*Ricinus communis* L.) sobre a lagarta-do-cartucho do milho,

S. frugiperda, sendo analisados a duração e viabilidade das fases larval e pupal, peso de pupa, fecundidade, fertilidade e longevidade de adultos. O extrato aquoso de *R. communis* apresentou bioatividade nos parâmetros duração larval e pupal e peso de pupa, enquanto o extrato de *R. graveolens* reduziu o peso de pupa. O extrato de folhas e ramos de *M. charantia* reduziu a viabilidade larval e o peso de pupa. Já o extrato aquoso de folhas de *L. sidoides* não afetou a fase larval e pupal, mas reduziu a postura e a viabilidade de ovos e aumentou a longevidade de adultos de *S. frugiperda*. A viabilidade de pupa não foi afetada pelos extratos estudados.

Karahroodi et al. (2009) avaliaram o potencial de repelência dos óleos essenciais de 17 plantas sobre adultos da mariposa *Plodia interpunctella* (Huebr) verificando que os maiores índices de repelência foram obtidos pelos óleos essenciais das espécies *Anethum graveolens* (Dill) *Thymus vulgaris* L. e *Rosmarinus officinalis* L. com percentuais de repelência entre 93,33 e 100%, respectivamente.

Migliorini et al. (2010) testaram nove espécies de vegetais: salvia (*Salvia officinalis* L.), cravo (*Eugenia caryophyllata* Thunb), noz-moscada (*Myristica fragans* Houtt), cinamomo (*Melia azedaracha* L.), timbó (*Ateleia glazioviana* Baill), eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), figueira (*Ficus microcarpa* L.), alecrim (*R. officinalis*), sobre o inseto *Diabrotica speciosa* Germar e observaram que os extratos mais eficientes foram o timbó, noz-moscada e cinamomo, com porcentagens de eficiência variando entre 80,4% e 100%.

Soares et al. (2011) avaliaram o efeito inseticida dos óleos essenciais extraídos de *Piper hispidinervum* C.D.C., *Cymbopogon citratus* Stapf, *Citrus limon* (L.) Osbeck, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry e *R. officinalis* sobre a lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* Stoll. Foram usadas três concentrações (1%, 5% e 10 % v/v), diluídas em acetona, sendo testadas sobre lagartas do 3º ínstar. Os óleos essenciais de *P. hispidinervum*, *C. citratus* e *S. aromaticum* foram eficientes no controle de *T. arnobia*.

3.5.5 Controle biológico de cochonilhas por extratos vegetais

Poucas são as pesquisas realizadas sobre o uso de bioinseticidas de origem vegetal no controle de espécies de cochonilhas. Neste sentido, Guirado et al. (2003) avaliaram a eficiência de controle do óleo extraído de sementes de Nim (*A.indica*) aplicado isoladamente e em associação com óleo mineral (Triona) no controle da cochonilha escama-farinha *Unaspis citri* (Comstock). Os autores constaram que óleo de Nim (1%) associado a óleo mineral (1%) causou a morte de 86,21% da cochonilha após 16 dias do tratamento.

Com o objetivo de conhecer o potencial de algumas plantas no controle da cochonilha-branca, *P. citri*, Santa-Cecília et al. (2010) avaliaram a atividade de extratos de 188 diferentes

espécies de plantas coletadas na região Sul do estado de Minas Gerais. Dentre os extratos avaliados, apenas o extrato da casca do abacate (*Persea americana* Mill), na concentração de 250mg/mL, foi eficiente, causando mortalidade acima de 77% de ninfas de *P. citri* em cafeeiro.

3.5.6 Controle de *Dactylopius opuntiae* por substâncias vegetais

Pesquisas visando à busca de novas alternativas para o controle de *D. opuntiae* vêm sendo realizadas. Assim, Guzmán (2007) testaram a atividade inseticida dos extratos de *Chenopodium ambrosioides* L., *Mentha piperita* L., *M. viridis* L., *Ocimum basilicum* L., *Ruta graeolens* L., *Tagetes erecta* L. *T. florida* L. e *Origanum vulgare* L. sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, em laboratório e no campo. Todos os extratos causaram a mortalidade do inseto, sendo os mais eficientes *M. piperita*, *M. viridis* e *T. erecta*.

Lopes et al. (2009) avaliaram o efeito o óleo de laranja Prev-Am (Sodium tetraborahydrate decahydrate) sobre *D. opuntiae*, em uma plantação de palma gigante no município de Monteiro/Paraíba. O óleo de laranja foi testado nas concentrações 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% e 0,7%, causando a mortalidade de ninfas e fêmeas adultas do inseto, com maior eficiência para as concentrações 0,6% e 0,7%.

Gorlach-Lira e Lira (2011) avaliaram a ação do óleo de Nim nas concentrações 1%, 2% e 3% sobre *D. opuntiae* em cladódios, após 21 dias. As concentrações do Nim causaram a eliminação da maioria das colônias, sendo eficiente no controle da cochonilha na plantação no município de Monteiro/ Paraíba.

Lacerda et al. (2011) analisaram o óleo de semente de Nim (1% e 2%), óleo mineral (2%) e manipoeira (50% e 100%) extraído de *Manihot esculenta* Crantz sobre a cochonilha-do-carmim, em casa de vegetação. Os autores constataram que os óleo de Nim (2%) e óleo mineral (2%) apresentaram redução da infestação do inseto de 10% e 91,6%, respectivamente, enquanto o extrato da manipoeira causou redução entre 54,16 e 62,50%.

3.5.7 Controle de *Nasutitermes corniger* por substâncias vegetais

Estudos sobre a ação de extratos vegetais são realizados por pesquisadores brasileiros, visando o controle biológico de *N. corniger*, em áreas urbanas. Neste sentido, Peres Filho et al. (2006) relatam a avaliação do efeito de extratos de *Erismia uncinatum* Warm., *Hymenaea courbaril* L., *Aspidosperma populifolium* A.DC., *Bagassa guianensis* Aubl., e *Cecropia* sp. sobre *Nasutitermes* sp. *B. guianensis* e *E. uncinatum* causaram maiores índices de mortalidade do cupim.

Soares et al. (2008) verificaram o efeito de óleos e extratos aquosos de folhas de *A. indica* e

Cymbopogon winterianus Jowitt sobre este cupim. Discos de papelão foram imersos em soluções contendo extratos aquosos e óleos de citronela e Nim nas concentrações de 1%, 5% e 10% (p/v) e 0,1%, 0,2% e 0,3% (v/v), respectivamente, e colocados em recipientes com vinte cupins e foi selecionada a melhor concentração (extratos de Nim e citronela a 5% e os óleos a 0,2%) a ser testada sobre o cupim. O óleo de citronela foi mais eficiente com maior média de mortalidade do inseto, sendo que esses produtos nas dosagens testadas possuem ação inseticida de contato e ingestão para *N. corniger*.

Sá et al. (2009) avaliaram ação do extrato aquoso e metanólico do cerme de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sobre *N. corniger* e espécies de *Fusarium*. Os extratos compostos pelos metabólitos secundários (ácido gálico, flavonóides, luteolina, derivados de cinamico, proantocianidinas, taninos hidrolisáveis e leucoanthocianidinas) apresentaram atividade antioxidante e inibiram o crescimento das espécies de *Fusarium*. O extrato aquoso foi eficiente contra *Fusarium decemcellulare* Brick, *F. moniliforme* J. Seheld, *F. oxysporum* Schelecht emend. Snyder & Hansen e *F. solani* (Mart.) Sacc., não sendo eficiente contra *F. lateritium* Nees. O extrato metanólico não foi eficiente no controle das espécies de *Fusarium*. A mortalidade de *N. corniger* foi induzida pelo extrato aquoso, mas este não mostrou a atividade de repelência. Entretanto, o extrato metanólico não mostrou atividade termicida, mas foi repelente ao inseto.

A atividade termicida dos extratos de *Bowdichia virgilioides* Kunth, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. e *Hymenaea stigonocarpam* Mart. ex Hayne sobre *N. corniger* foi avaliada em laboratório por Santana et al. (2010). Os extratos possuem compostos termicidas, sendo que o extrato de *B. virgilioides* apresentou maior atividade e foi repelente ao inseto. Os extratos de *A. colubrina* e *H. stigonocarpam* também foram eficientes na diminuição da sobrevivência de *N. corniger*.

Barbosa et al. (2011) avaliaram a ação do extrato de clorofórmico obtido de *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vanio e do ácido barbático obtido de *Cladia aggrgata* (Sw) Nyl. sobre os operários e soldados de *N. corniger* nas concentrações de 5 mg/mL, 7 mg/mL e 10 mg/mL das substâncias liquênicas. O ácido barbático e o extrato clorofórmico interferiram significativamente na taxa de sobrevivência dos operários nas concentrações testadas, enquanto não foram eficientes sobre os soldados. Os dados demonstraram que as substâncias liquênicas podem ser usadas no controle biológico de *N. corniger*.

A eficiência do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. sobre operários e soldados de *N. corniger* foi avaliada por Lima et al. (2012). O extrato foi eficiente contra as castas do cupim, causando 100% de mortalidade dos operários e soldados após o 3º dia de observação. Os autores sugerem que o extrato aquoso é formado por compostos secundários que têm ação inseticida contra

N. corniger, sendo este uma alternativa viável a ser testada no controle desse cupim, nas áreas urbanas do Nordeste.

Substâncias de origem vegetal, como as lectinas, tem sido testadas no controle de cupins. Neste sentido, Sá et al. (2008) avaliaram o efeito da lectina de *M. urundeuva* sobre indivíduos de *N. corniger*, por meio de bioensaios de mortalidade e repelência. Todas as concentrações testadas da lectina induziram a mortalidade do inseto, sendo que os valores de CL₅₀ para os operários e soldados, após o quarto dia de tratamento, foram de 0,248 mg/mL e 0,199 mg/mL, respectivamente. Entretanto, o ensaio de repelência indicou que a lectina não induziu um efeito de rejeição. Este é o primeiro relato do efeito tóxico de lectinas sobre cupins.

A lectina de raízes de *Bauhinia monandra* Kurz (BmoRoL) foi purificada por cromatografia de fracionamento e afinidade de sulfato de amônio em gel e, em seguida, a atividade termicida e fungicida foram testadas sobre *N. corniger* e espécies fitopatogênicas de *Fusarium*. A lectina mostrou atividade antifúngica contra fitopatógenos, com maior ação sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. A atividade termicida foi comprovada contra operários e soldados do cupim, com CL₅₀ de 0,09 mg/L e 0,395 mg/L, respectivamente, após 12 dias (SOUZA et al., 2011).

A biodegradação por cupins causa prejuízos para as indústrias de madeira e das culturas em todo o mundo, assim, o uso de novas técnicas para controle desses insetos é de suma importância. O efeito dos extratos e das lectinas purificadas de cladódios da palma forrageira (*O. fícus-indica* (OfiL)) e de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck (WSMoL e cMoL) sobre operários e soldados de *N. corniger* foi testado. A lectina (OfiL) foi mais ativa que os extratos dos cladódios, com maior atividade de termicida contra os operários (CL₅₀ de 0,116 mg/mL), enquanto a lectina mostrou ação contra soldados na concentração de 1,50 mg/mL. Os extratos e a lectina de *M. oleifera* foram eficientes nas concentrações de 1,00 mg/mL e 1,50 mg/mL. Nenhuma das preparações testadas apresentou atividade repelente contra *N. corniger*. A lectina (OfiL) pode ser uma nova alternativa para o controle biológico de *N. corniger* (PAIVA et al., 2011).

Araújo et al. (2012) purificaram a lectina da casca de *Crataeva tapia* L. (CrataBL) por cromatografia de troca iônica. A lectina foi classificada como termoestável e similar às proteínas de defesa de plantas. Essa lectina foi testada contra operários e soldados de *N. corniger* e, seu potencial inseticida foi comprovado sobre os operários, com CL₅₀ de 0,475mg/ mL, após seis dias.

3.6 *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*)

O gênero *Caesalpinia* é composto por cerca de 140 espécies, além de incluir 25 nomes genéricos sob sua sinonímia (LEWIS, 2005), sendo o gênero classificado como polifilético, o qual foi dividido em dez gêneros, como *Erythrostemon*, *Libidibia*, e *Poincianella*, de acordo com recentes

estudos filogenéticos baseados em dados moleculares e morfológicos (SIMPSON e LEWIS, 2003; SIMPSON et al., 2003; QUEIROZ, 2010).

Um estudo de levantamento sobre as leguminosas da Caatinga apresentou novas combinações para as leguminosas do Brasil, como *Erythrostemon*, *Libidibia*, e *Poincianella* (QUEIROZ, 2009), e para organizar a taxonomia das espécies de *Caesalpinia* da Caatinga Brasileira, entre estas, *Caesalpinia ferrea* (Mart. Ex Tul.), foram propostas seis novas combinações incluídas nos gêneros *Libidibia* e *Poincianella* (QUEIROZ, 2010).

Caesalpinia ferrea é uma leguminosa utilizada na ornamentação de praças e vias públicas, na indústria farmacêutica e em plantio de áreas degradadas (RIZZINI e MORS, 1995; PRANCE e SILVA, 1975; LORENZI, 2002). Esta leguminosa foi designada como *Caesalpinia ferrea* por Martius em 1828, porém foi descrita por Tulasne em 1844 (TULASNE, 1844). Posteriormente, Baillon (1876) transferiu a espécie para o gênero *Apuleia* e Lewis (2005) removeram o gênero *Libidibia* de *Caesalpinia*, visto que o gênero *Caesalpinia* é considerado polifilético.

A espécie *Caesalpinia ferrea* e suas respectivas variedades foram reclassificada para o gênero *Libidibia*, ressaltando que esse gênero constitui um grupo de espécies muito semelhantes, presentes em florestas secas neotropicais, com variedades e complexidade e difícil de interpretar, possuindo muitos intermediários entre a espécie e outras espécies afins. Esta reclassificação foi baseada em dados moleculares e morfológicos da planta, sendo a espécie atualmente classificada como *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (QUEIROZ, 2009; 2010)

Libidibia ferrea (= *Caesalpineia ferrea*) é uma árvore com porte de 10 a 20 m, tronco curto de 40-60 cm de diâmetro e com bifurcações quando isolada, com casca externamente acinzentada, lisa e fina, com manchas brancas irregulares, que contrastam com o fundo escuro do tronco, sendo que essa renova anualmente; internamente é amarelo clara, escurecendo em contato com o ar. Apresenta copa arredondada, fechada, densa, formada por folhas compostas, pinadas com estípulas precocemente caducas e pecíolos com 3 cm de comprimento (Figura 13). As flores são zigomorfas e pequenas, de cor amarela, reunidas em panícula terminal de até 20 cm de comprimento. Apresenta fruto do tipo legume bacóide, de coloração preto-avermelhada, indeiscente, chato, que ao amadurecer se torna negro. Cada fruto contém 2 a 10 sementes elipsóides e duras, de cor amarela ou marrom (LORENZI, 2002; MACHADO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012).

Machado et al. (2006) identificaram espécies nativas na arborização urbana de Teresina, Piauí, e catalogaram as informações botânicas e paisagísticas sobre algumas árvores. Foram identificadas 48 espécies de árvores nativas, distribuídas em 42 gêneros e 21 famílias botânicas, sendo a família Caesalpiniaceae de maior representatividade, com seis gêneros e sete espécies. Das espécies analisadas, foram selecionadas as seguintes, com grande potencialidade para a arborização da cidade: *Cenostigma macrophyllum* Tul. (caneleiro) e *L. ferrea* (jucá), indicadas para praças,

canteiros centrais com mais de 4,0 m de largura, jardins públicos e estacionamentos; *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan (angico preto), *Licania tomentosa* Benth. (oiti), *Enterolobium contorsiliquum* (Vell.) Morang (tamboril), *Parkia platycephala* Benth. (faveira), *Astronium fraxinifolium* Schott. (gonçalo-alves) e *Hymenea courbaril* L. (jatobá) para praças e parques; *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (carnaúba), para canteiros centrais e composições em praças e jardins e *Magonia glabrata* A. St.-Hil. (tingui), uma sapindácea de porte médio, para a arborização de passeios.

Loiola et al. (2010) realizaram um inventário florístico em quatro comunidades rurais no município de São Miguel do Gostoso (RN) para obtenção de informações sobre utilização das plantas e de amostras botânicas junto às comunidades. Foram registradas 102 espécies, pertencentes a 73 gêneros e 30 famílias, sendo que as famílias Leguminosae, Fabaceae, Asteraceae e Euphorbiaceae foram as mais significativas em número de espécies. A maioria das espécies de Leguminosae possui valor econômico, pois são usadas como produto medicinal e veterinário, como forragem animal e combustível, além de serem utilizadas em processos tecnológicos e na construção civil. Entre estas espécies foram encontradas *L. ferrea* e *Senegalia bahiensis* Benth, as quais são interessantes para o manejo de animais, uma vez que servem de alimento (folhas, flores, vagens e sementes) na época seca.



Figura 13. Espécime de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

As plantas medicinais podem ser utilizadas como fontes alternativas de nutrientes minerais na dieta alimentar. Neste contexto, o teor e a biodisponibilidade de ferro, manganês e zinco em extratos da casca do fruto e das folhas de *L. ferrea* foram avaliados por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS). O nutriente ferro apresentou melhor biodisponibilidade na casca do fruto e nas folhas, e o manganês e zinco se mostraram mais biodisponíveis nas folhas. A casca do fruto e as folhas do pau-ferro apresentaram altos níveis dos nutrientes minerais quando comparados com outras plantas medicinais, e pode ser uma fonte alternativa de ferro, manganês e zinco na dieta alimentar (SILVA et al., 2010).

Por outro lado, o pó da casca de *L. ferrea* é utilizado pela população do Rio Grande do Norte/Brasil, para o tratamento de feridas cutâneas, despertando o interesse do pó dos diversos tecidos da planta para os estudos nas áreas de biotecnologia e farmacologia (XIMENES, 2004). Neste sentido, Oliveira et al. (2010) avaliaram a cicatrização de feridas cutâneas em caprinos tratados com uso tópico da pomada de *L. ferrea* (pó da casta misturada a vaselina esterilizada) por meio da análise clínica, morfométrica, histopatológica e bacteriológica do processo cicatricial até o 21º dia de pós-operatório. A pomada foi aplicada diariamente sobre a ferida circular padronizada (16 cm de área) na região torácica de cada animal, sendo aplicada no grupo controle apenas a vaselina esterilizada. As avaliações demonstraram que houve completa epitelização das feridas tratadas com a pomada até o 21º dia, enquanto que as feridas do grupo controle precisaram de mais tempo para o processo cicatricial. Já na análise microbiológica foi verificada a presença de bactérias da família Enterobacteriaceae e *Staphylococcus aureus* Rosenbach apenas no grupo controle, a partir do 14º dia. Os autores constataram eficiência significativa da pomada à base de *L. ferrea* na reparação cicatricial de feridas cutâneas de caprinos.

Oliveira e Silva (2011) analisaram a atividade antimicrobiana de plantas da Caatinga sobre *Bacillus subtilis* Cohn, *Candida albicans* Berkhout, *Escherichia coli* (T. Escherich), *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan), *Micrococcus luteus* (Schoeter) Cohn e *S. aureus*. Os dados obtidos demonstraram que os extratos de *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R.A. Howard, *M. urundeuva* e *Poincianella microphylla* (Mart. ex G. Don) L. P. Queiroz e de *L. ferrea* apresentaram atividade antimicrobiana e antioxidante sobre os microrganismos.

3.7 *Agave sisalana*

O gênero *Agave*, pertencente à família Agavaceae, é constituído por mais de 650 espécies, distribuídas nas áreas áridas de clima tropical e subtropical em todo mundo, tendo como origem e centro de dispersão o México, América Central, Antilhas e Sudoeste dos Estados Unidos. No

território brasileiro são encontrados quatro gêneros e cerca de 20 espécies dessa família (ABDEL-GAWAD et al., 1999; IRISH, 2000). O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é planta semixerófito, que se desenvolve em clima quente e de grande luminosidade, sendo estas condições encontradas na região do Nordeste do Brasil, onde se estabeleceu e expandiu seu cultivo. Por suas características peculiares, *A. sisalana* se adaptou bem à região semiárida brasileira, com condições favoráveis para o seu crescimento. Foi introduzida inicialmente no estado da Paraíba e depois se disseminou para outros estados, como a Bahia (CNA, 2010).

A espécie *A. sisalana* é uma planta herbácea e perene, com ciclo de vida que varia entre oito a 10 anos. Possui caule quase ausente (acaulescente) e forma folhas grandes, lanceoladas e lineares, sem pecíolo, que variam de 1,2 a 2,0 m de comprimento e de 9 a 12 cm de largura; carnosas, duras, de coloração verde-lustrosa e dispostas em espiral, convexas e canaliculadas na parte superior, apresentando ápice com espinho (marrom escuro), margem irregularmente acauleada e pendão floral de aproximadamente 6 a 9 m de altura por 15 cm de diâmetro (Figura 14). Apresenta raiz fasciculada, fibrosa e em forma de tufo, típica das monocotiledôneas (IRISH, 2000).

O sisal floresce uma vez em todo ciclo de vida, morrendo logo em seguida; produz inflorescência do tipo panícula, de forma variável, em geral oblongo piramidal; possui entre 25 e 40 ramos principais com uma média de 40 flores. Estas são hermafroditas e agrupadas em cachos localizadas no final de cada ramo, com o perianto formado por seis sépalas unidas na base, com ovário localizado abaixo da inserção das demais partes da flor, sendo sua polinização realizada, em geral, por insetos. *A. sisalana* produz frutos em forma de cápsulas, medindo cerca de 3,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro, com três lóculos, nos quais as sementes (delgada e de forma redondo-triangular, de cor preta) se distribuem em duas colunas (IRISH, 2000; SOUZA e LORENZI, 2005).

Neto e Martins (2012) estudaram a anatomia dos órgãos vegetativos de plantas saudáveis do sisal, visando contribuir para a produção desse vegetal, assim como para os estudos de fitopatologia e fitotecnia da espécie. As amostras do sisal foram processadas por meio de técnicas usuais em anatomia vegetal, e também foram utilizados os testes histoquímicos como o Sudan Red e Sudan Black para evidenciar substâncias lipofílicas. Foram observadas diversas características peculiares a plantas adaptadas ao ambiente árido, tais como: cutícula espessa em ambas as faces da lâmina foliar; folhas anfiestomáticas que apresentam estômatos tetracíticos, longas câmaras subestomáticas, mesófilo isobilateral, epiderme uniestratificada, papilas, flanges cuticulares e feixes vasculares colaterais dispostos alternadamente e acompanhados por bainha de fibras; raiz apresenta velame, córtex com células grandes e arredondadas e três camadas de esclereídes junto à endoderme unisseriada, com rizoma do tipo atactostelo, sem a presença de endoderme.



Figura 14. Plantação de *Agave sisalana* localizada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA)-Recife. Fonte: próprio autor. Lopes (2013).

Branco et al. (2010) investigaram a composição do açúcar principal dos resíduos líquidos da folha de sisal. O fracionamento do extrato etanólico desses resíduos pela cromatografia de coluna com SiO_2 resultou no isolamento de D-mannitol. A presença desse composto nos resíduos de biomassa do agave pode acrescentar valor econômico à cadeia de produção de fibra de sisal no Nordeste do Brasil, pois o D-mannitol é largamente usado na indústria farmacêutica e como uma matéria-prima para produzir vários tipos do polímero.

Brandão et al. (2011) estudaram os nutrientes digestíveis totais (NDT), a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e a cinética de fermentação ruminal do bulbilho e pseudocaule do sisal e dos coprodutos do desfibramento do sisal (CDS) na forma de silagem, feno e amonização com 5% de uréia e do pó da bateadeira das fibras de sisal. Os autores constataram que os valores da matéria seca variaram de 11,4 % a 89,7% na silagem e no feno do CDS, respectivamente. Entretanto, o CDS amonizado teve como maior valor de proteína bruta, 22,7%. Ainda, no pseudocaule e no pó da bateadeira não foi detectada a presença de extrato etéreo e, os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram mais altos no pseudocaule (72,7%) e no bulbilho (69,5%). Também não houve diferença nos valores de DIVMS entre os alimentos avaliados, onde o pó da bateadeira apresentou os maiores valores de NDT. Os teores de fibra em detergente ácido, de CNF e de produção cumulativa de gases do pó da bateadeira, bulbilhos e pseudocaule os qualificam como

volumosos de baixo teor de fibra e alta digestibilidade.

O sisal é conhecido mundialmente como fonte de fibras duras e o Brasil é o maior produtor deste vegetal, pois produz mais de 246.000 toneladas. No entanto, o processo de remoção das fibras da folha sisal gera resíduos de 95%. Portanto, foi avaliado o efeito da proporção de líquido/sólido (%), tempo (minutos) e temperatura (°C) sobre o rendimento de pectina obtida de resíduos de sisal. O rendimento da pectina extraída variou de 4,61% a 19,2%, sendo que as condições que produziram maior rendimento (19,2%) foi à temperatura de 85 °C, tempo de extração de 60 minutos e uma proporção de líquido/sólido de 2% (SANTOS et al., 2013).

A composição química dos extratos lipofílicos das fibras do sisal foi analisada através de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS) por Gutiérrez et al. (2008). Para análise mais detalhada, o extrato foi fracionado em fase sólida e as frações obtidas foram analisadas por GC e GC/MS. Os seguintes compostos foram identificados: ácido graxo (30% de lipídios totais), álcool graxo (20%), esteróis livres e alcanos (11%) e uma série de ésteres de ácido ferúlico (10%). Também, foram identificados hidrocarbonetos, esteróides, cetonas, monoglicéridos, aldeídos, ceras, esteróis e glicosídeos.

Chen et al. (2009) isolaram três flavonas e sete homoisoflavonóides conhecidos do extrato metanólico das folhas de *A. sisalana* e as estruturas desses compostos foram definidas com base na análise espectroscópica. Os compostos isolados também foram avaliados para atividade imunofarmacológica. Os resultados mostraram efeitos inibitórios sobre a proliferação de PBMC ativado por PHA com valores de IC₅₀ igual a 19,4 µM e 73,8 58,8 µM, respectivamente. Todos os três compostos inibiram significativamente a produção de IL-2 e IFN-γ em PBMC registrado de forma concentração-dependente.

Santos et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos dos resíduos gerados a partir do processo de obtenção de fibras das folhas de *A. sisalana*. Tal atividade foi determinada pelo método de difusão do disco de papel usando fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas, resistentes e não resistentes aos antibióticos. O extrato hidroetílico inibiu significativamente *Candida albicans* Berkhout, e foi inativo contra as cepas de *S. aureus*, *Escherichia coli* T. Escherich e *Micrococcus luteus* Fleming, *Bacillus cereus* Frankland & Frankland e *Salmonella choleraesuis* Lignieres e *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter. Ainda, o extrato metanólico mostrou baixa ação inibitória para *C. albicans* quando comparado com o extrato hidroetílico e não foi eficiente contra outros microrganismos testados.

A ação inseticida dos resíduos líquidos e compostos metabólitos secundários (alcalóides, saponinas e taninos) de *A. sisalana* é comprovada contra artrópodes (BARRETO, 2003). Barreto et al. (2010) avaliaram a eficiência dos extratos frescos (24 horas após a maceração) e curados (35 dias depois) de dois genótipos de *A. sisalana* no controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae*

(Koch) e *Iphiseiodes* sp. do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch) e os efeitos de fitotoxidez dessas aplicações. Além disso, foi avaliado o percentual de plantas afetadas e a intensidade dos sintomas de fitotoxidez em plantas de algodoeiro aos 10, 35 e 65 dias após a germinação. Foi observada a diminuição do número de ácaros vivos com as aplicações dos extratos do sisal. A eficiência do extrato do híbrido foi de 100%, enquanto o percentual de plantas afetadas foi de 100% quando pulverizadas nas duas faces da folha e a intensidade da fitotoxidez foi classificada como de muito leve a leve aos 10 e 35 dias e forte aos 65 dias após a germinação.

Botura et al. (2013) avaliaram a atividade vermífuga dos extratos aquoso (AE), acetato de etila (EE), frações de flavonóides (FF) e frações de saponina (SF) obtidos de resíduos do sisal contra helmintos gastrintestinais de caprinos. A fração de SF não foi eficiente no controle dos ovos. O percentual de eficiência observado para o LMI foi 50,3%, 33,2% e 64,1% para AE, EE e SF, respectivamente. A fração de FF não mostrou atividade contra as larvas e a análise dessa fração indicou a presença de um homoisoflavonóide em sua composição. Estes dados indicam que *A. sisalana* possui atividade contra helmintos gastrintestinais de caprinos, sendo essa atividade relacionada aos compostos homoisoflavonóides e saponina, que tem ações diferentes em cada estágio do desenvolvimento do nematóide.

3.8 Compatibilidade de inseticidas químicos e de substâncias vegetais sobre os fungos entomopatogênicos

Os fungos estão entre os inimigos naturais que podem ser influenciados pela aplicação de produtos químicos, e por possuir grande diversidade e intensa capacidade de multiplicação, podem-se selecionar linhagens resistentes a agrotóxicos, as quais podem ser utilizadas em conjunto aos produtos químicos (GHINI e KIMATI, 2000). Estes podem causar efeitos negativos aos entomopatógenos, sendo necessário o uso de produtos compatíveis a esses organismos. A utilização inadequada de produtos químicos pode alterar o desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos, pois diminui a sua eficiência, além de favorecer o aumento das populações das pragas (CAVALCANTI et al., 2002). Em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) é necessário utilizar inseticidas e fungos entomopatogênicos selecionados como uma estratégia viável ao controle de pragas na agricultura (SANTOS et al., 2009).

Os insetos-praga vêm sendo controlados com o uso de produtos fitossanitários sintéticos, porém o uso indiscriminado desses inseticidas causa efeitos prejudiciais ao meio ambiente, aos animais, bem como aos inimigos naturais das pragas agrícolas. Assim, os fungos entomopatogênicos são diretamente prejudicados por estes produtos, pois podem inibir o crescimento micelial, a produção e a germinação dos conídios e o processo de patogenicidade e

virulência destes microrganismos (CAVALCANTI et al., 2002). Pesquisas sobre inseticidas mais seletivos utilizados na agricultura são importante, pois visam à adequação no uso para que esses não eliminem ou diminuam a ação dos inimigos naturais, podendo ter uma interação sinérgica quando utilizados em associação com os entomopatógenos (ALVES et al., 1998).

Moino Júnior e Alves (1998) analisaram o efeito fungitóxico dos inseticidas Imidacloprid e Fipronil sobre *M. anisopliae* e *B. bassiana* por meio da medição do crescimento micelial e produção de conídios quando os fungos foram inoculados em meio de cultura contendo os inseticidas. O produto Imidacloprid foi menos tóxico para os fungos que o Fipronil, sendo que *M. anisopliae* foi menos suscetível que *B. bassiana* aos dois inseticidas.

A toxicidade de 93 produtos fitossanitários recomendados para o controle de pragas e doenças de culturas olerícolas e ornamentais sobre *B. bassiana* foi estudada por Tamai et al. (2002). Dos 36 fungicidas testados, apenas três foram compatíveis com o fungo. Ainda houve grande variação na toxicidade dos produtos dentro de cada grupo químico e com produtos da mesma molécula química.

Loureiro et al. (2002) avaliaram o efeito de oito fungicidas e doze inseticidas utilizados nas culturas de alface e crisântemo sobre o crescimento e esporulação de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *V. lecanii*, sendo que apenas o inseticida Imidacloprid foi compatível com as espécies fúngicas estudadas.

Cavalcanti et al. (2002) avaliaram o efeito dos produtos químicos Imidacloprid, Thiamethoxan, Fenpropatrina e Iprodione sobre a germinação, crescimento micelial, esporulação e a patogenicidade a *G. melonella* de *B. bassiana* e constataram que os inseticidas Imidacloprid e Thiamethoxan, foram compatíveis ao fungo nos parâmetros analisados. Já o Fenpropatrina reduziu o crescimento vegetativo e a produção de conídios de *B. bassiana*, enquanto o inseticida Iprodione foi classificado como incompatível ao patógeno, pois afetou todos os parâmetros avaliados, exceto a germinação.

Almeida et al. (2003) estudaram o efeito de duas formulações do inseticida Acetamiprid sobre os fungos entomopatogênicos aplicados no sulco de plantio de cana-de-açúcar pela introdução inundativa por meio de iscas Termitrap para o controle de *H. tenus*. O tratamento com Acetamiprid /a 2% GR-10kg/há obteve maior produtividade na plantação de cana-de-açúcar e o tratamento com *B. bassiana*-30kg/há apresentou menor população de cupins nas soqueiras e iscas após colheita.

O efeito de agrotóxicos aplicados nas culturas do cafeeiro sobre *B. bassiana* UEL114 foi avaliado por Andaló et al. (2004). Os autores constataram que os produtos Thiamethoxan, Imidacloprid, Carbofuran e Pencycuron foram compatíveis ao fungo, podendo ser testados em associação no controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro.

Almeida et al. (2007) analisaram a eficiência de diferentes classes de adjuvantes em associação com o inseticida Thiamethoxan ou com *M. anisopliae*, no controle de *Mahanarva*

fimbriolata (Stal). O adjuvante AgRho DEP-775 (0,05%) pode ser usados em associação com *M. anisopliae* contra o inseto, enquanto os adjuvantes Silwet Plus e Silwet L-77 também podem ser usado em associação com o Thiamethoxan.

A associação de extratos vegetais com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle de insetos-praga, reduzir o custo e impactos ambientais (MARQUES et al., 2004). Visando este objetivo os autores avaliaram a ação do óleo de nim (NIM-I-G), (extraído de *A.indica*) sobre o crescimento, esporulação e viabilidade de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa*. Os fungos foram inoculados em BDA com diferentes concentrações do óleo de Nim (C1: 5% do óleo e, sucessivas concentrações equivalentes a $\frac{1}{2}$ da concentração anterior até C11: 0,00485%). O crescimento micelial das colônias de *B. bassiana* e *I. farinosa* foi reduzido, exceto em C11, enquanto para *M. anisopliae* o óleo não teve efeito a partir da C8 (0,33%). A esporulação foi significativamente reduzida pelo óleo de Nim, contudo a germinação dos fungos não foi afetada, demonstrando assim o potencial da utilização de esporos fúngicos associados em solução de óleo de nim, o que pode aumentar a eficiência do fungo no controle de insetos-praga, além de reduzir os custos e os impactos ambientais causados pelo o uso de inseticidas químicos.

Santos et al. (2009) avaliaram em laboratório a compatibilidade de *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* com o óleo de Nim por meio dos índice de crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios. Os resultados mostraram que o inseticida inibiu a esporulação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e, reduziu crescimento micelial de *M. anisopliae* var. *acridum*, quando comparados com tratamento controle.

4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GAWAD, M.M.; EL-SAYED, M.M.; ABDEL-HAMEED, E.S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 1371-381, 1999.

ADAGRI-CE. 2008. **Cochonilha do carmim**. Disponível em <<http://www.adagri.ce.gov.br/defesa-vegetal/cochonilha-do-carmim>>, Acesso em: 23 maio. 2011.

AL-JUHAIMI, F.; ÖZCAN, M.M. Determination of some mineral contents of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed flours. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 3659-3663, 2013.

ALBUQUERQUE, A.C.; PEREIRA, K.C.A.; CUNHA, F.M.; VEIGA, A.F.S.L.; ATHAYDE, A.C.R.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgreen) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 585-591, 2005.

ALBUQUERQUE, A.C.; MATIAS, G.R.R.S.; COUTO, A.V.O.; OLIVEIRA, M.A.P.; VASCONCELLOS, A. Urban térmites of Recife, Northeast Brazil (Isoptera). **Sociobiology**, v. 59, p. 183-188, 2012.

ALI-SHTAYEH, M.S.; MARA, A.B.B.M.; JAMOUS, R.M. Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. **Mycopathologia**, v. 156, p. 235-244, 2002.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 20, p. 30-33, 2001.

ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; MOINO, A.; LOPES, R. Controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) com iscas Termitrap impregnadas com inseticidas e associadas ao fungo *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 639-644, 1998.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; COSTA, E.A.D. Efeito de adjuvantes em associação

com o Thiamethoxan 250 WG e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera; Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 135-140, 2007.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; SHITARA, T. Avaliação de inseticidas e fungos entomopatogênicos para o controle de cupins subterrâneos da cana-de-açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 347-353, 2003.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 11, p. 289-371.

ALVES, S.B; ALMEIDA, J.E.; MOINO, A.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. Uso de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) em pastagens. **Ecossistema**, v. 20, p. 50-57, 1995.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratórios . In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 20, p. 637-710.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 3, p. 69-110.

ALVES, S.B.; MASCARIN, G.M.; PAULI, G.; GUARIN-MOLINA, J.H.; LOPES, R.B. Suscetibilidade de *Planococcus citri* a fungos entomopatogênicos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007. Brasília. **Resumos ...** Brasília DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Documentos, 250.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, V.C.; SOUZA, G. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 71, p. 181-187, 2004.

ARAÚJO, R.M.S.; FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CUNHA, M.G.C.; COELHO, C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V.; PAIVA, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, 20-26, 2012.

AZEVEDO, J.L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. EMBRAPA: Jaguariúna, 1998. cap. 2, p.69-96.

AZEVEDO, N.R.; NETO, J.R.O. Componentes químicos voláteis (terpenos) da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Termitidae: Nasutitermitinae), coletados na região urbana de Goiânia. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu/MG. **Anais ...** Minas Gerais: Sociedade de Ecologia do Brasil (SEB), 2007. p. 1-2.

BADII, M.H.; FLORES, A.E. Prickly pear cacti pest and their control in Mexico. **Florida Entomologist**, v. 84, p. 503-505, 2001.

BAILLON, E.H. **Dictionnaire de Botanique**. Paris: Librairie Hachette, 1876. 398p.

BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal no Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS, 2006. cap. 5, p. 56-61.

BANDEIRA, A.G.; VASCONCELLOS, A.; SILVA, M.P.; CONSTANTINO, R. Effects of habitat disturbance on the termite fauna in a highland humid forest in the Caatinga domain, Brazil. **Sociobiology**, v. 42, p. 117-127, 2003.

BAO, L.L.; YENDOL, W.G. Infection of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) with the *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. **Entomophaga**, v. 16, p. 345-352, 1971.

BARBERA, G. História e importância econômica e agroecologia. In: BARBERA, G.; INGLESES, P. (Eds.). **Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, 2001. cap. 1 p.1-11.

BARBOSA, F.S.; LEITE, G.L.D., PAULINO, M.A.O.; GUILHERME, D.O.; MAIA, J.T.L.S.; FERNANDES, R.C. Utilização de extratos de tiriirca no controle de *Diabrotica speciosa*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, p. 764-767, 2007.

BARBOSA, P.; MARTINS, M.; COSTA, M.; LOPES, R.S.; FALÇÃO, E.; PEREIRA, E.; LIMA, V.; SILVA, N. Efeito das substâncias liquênicas sobre *Nasutitermes corniger* In: ENCUESTRO DEL GRUPO LATINOAMERICANO DO LIQUENÓLOGOS – GLALX, 10., 2011, Bogotá, Colombia, **Anais ...** Bogotá: Impress- GLALX, 2011, p. 37-38.

BARRETO, A.F. **Efeitos do emprego de sucos de agave no tratamento de sementes, controle do ácaro rajado [*Tetranychus urticae* (Koch, 1836)] e fitotoxidade em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch).** 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Agromonia), Pós-Graduação em Agromonia, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2003.

BARRETO, A.F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B.F. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 207-215, 2010.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A.F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 107-113, 1994.

BEN SALEM, H., NEFZAOU, A., BEN SALEM, L. Supplementing spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) based diets with urea-treated straw or oldman saltbush (*Atriplex nummularia*). Effects on intake, digestion and sheep growth. **Journal of Agricultural Science**, v. 138, p. 85-92, 2002.

BERTI-FILHO, E.; FONTES, L.R. **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins.** Piracicaba: Fundação Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, 1995. 183p.

BIDOCHKA M.J.; ST LEGER R.J. Mechanisms of Deuteromycetes fungal infections in grasshoppers and locusts, an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 213-224, 1997.

BOTURA, M.B.; SANTOS, J.D.G.; SILVA, G.D.; LIMA, H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M. BRANCO, A. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p.

211- 217, 2013.

BRAGANÇA, L.A.R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: EDUFF,1996. 300p

BRANCO, A.; SANTOS, J.D.G.; PIMENTEL, M.M.A.M.; OSUNA, J.T.A.; LIMA, L.S.; DAVID, J.M. D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 507-510, 2010.

BRANDÃO, L.G.N.; PEREIRA, L.G.R.; AZEVÊDO, J.A.G.; SANTOS, R.D.; ARAGÃO, A.S.L.; VOLTOLINI, T.V.; NEVES, A.L.A.; ARAÚJO, G.G.L.; BRANDÃO, W.N. Valor nutricional de componentes da planta e dos coprodutos de *Agave sisalana* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1493-1501, 2011.

BRITO, C.H.; LOPES, E.B.; ALBUQUERQUE, I.C.; BATISTA, J.L. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-do-carmim na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, p. 1-5, 2008.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M.C.S.; DELITTI, W.B.C., DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 687-696, 2005.

BUSCHINI, M.L.T.; LEONARDO, A.M.C. Reproductive mechanisms in a *Nasutitermes* species (Isoptera: Termitidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 606-616, 1999.

CABANILLAS, H.E.; JONES, A. Pathogenicity of *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection**, v. 28, p. 333-337, 2009.

CARVALHO, J.C.T.; TEXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; SANTOS-FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, 175 -178, 1996.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L. Larvicidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569-571, 2003.

CASSANO, A.; CONIDI, C.; DRIOLI, E. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. **Desalination**, v. 250, p. 1101-1104, 2009.

CAVALCANTE, G.M.; MOREIRA, A.F.C.; VASCONCELOS, S.D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 9-14, 2006.

CAVALCANTI, V.A.L.B.; SENA, R.C.; COUTINHO, J.L.B.; ARRUDA, G.P.; RODRIGUES, F.B. **Controle das cochonilhas da palma forrageira**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 2001 (IPA Responde, 39).

CAVALCANTI, R.S.; MOINO JÚNIOR, A.; SOUZA, G.C.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários Fenpropatrina, Imidaclopride, Iprodione e Tiamethoxan sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 17-22, 2002.

CHAND, N., TIWARY, R.K., ROHATGI, P.K. Bibliography resource structure properties of natural cellulosic fibres-an annotated bibliography. **Journal of Materials Science**, v. 23, p. 381-387, 1998.

CHAVEZ-MORENO, C.K.A.; TECANTE, A.; CASAS, E.A. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 3337-3355, 2009.

CHEN, P.Y.; KUO, Y.C.; CHEN, C.H.; KUO, Y.H.; LEE, C.K. Isolation and Immunomodulatory Effect of Homoisoflavones and Flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules**, v. 14, p. 1789-1795, 2009.

CHIACCHIO, F.P.B. Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. **Revista Bahia Agrícola**, v. 8, p. 12-14, 2008.

CLEMENTS, F.E.; SHEAR, C.L. **The genera of fungi**. New Yor: Hafner Press, 1931. 632p.

CNA. **Sisal: problemas e soluções**. 2010. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>> Acesso em: 15 fev. 2013.

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 40, p. 387- 448, 1998.

CONSTANTINO, R. **An illustrated key to Neotropical Termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers.** 2002. Disponível em <<http://www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.html>> Acesso em: 06 set. 2012.

CONSTANTINO, R. **Online termite database.** Brasília: UnB, 2009. Disponível em:<<http://vsites.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/cat.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

COSTA, F.A. Janeiro carta-régia, pedindo informações sobre a cochonilha. **Anais Pernambucanos do Arquivo Público Estadual**, v. 7, p. 23-26, 1958.

COSTA, D.A.; FILHO, K.E.S.; BRANDÃO, D. Padrão de distribuição de cupins na região urbana de Goiânia. **Iheringia**, v. 99, p. 364-367, 2009.

COSTA-LEONARDO, A.M. **Cupins-praga: morfologia, biologia e controle.** Rio Claro-SP: Divisa, 2002. 128 p.

COSTA-LEONARDO, A.M.; CASARIN, F.E.; CAMARGO-DIETRICH, C.R.R. Identificação e práticas de manejo de cupins em áreas urbanas. In: PINTO, A.S.; ROSSI, M.M.; SALMERON, E. (Eds.). **Manejo de pragas urbanas.** Piracicaba: CP, cap. 2, 2007. p. 41-54.

CUNHA, G.A. **Dicionário histórico das palavras portuguesas de origem Tupi.** São Paulo: Melhoramento & EDUSP, 1989. 357 p.

CUNHA, F.M.; TEIXEIRA, V.W.; TEIXEIRA, A.A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; ALVES, L.C.; ALVES-LIMA, E.A.L. Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 293-297, 2009.

DAL-BELLO, G.; PADIN, S.; LÓPES-LASTRA, C.; FABRIZIO, M. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 77-84, 2001.

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

DAMAIN, A.L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 69, p. 1-39, 2000.

DE LOTTO, G. On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, v. 37, p. 167-193, 1974.

DEL-VALLE, V.; HERNÁNDEZ-MUNÓZ, P.; GUARDA, A.; GALOTTO, M.J. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus-indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. **Food Chemistry**, v. 91, p. 751-756, 2005.

DELEITO, C.S.R.; BORJA, G.E.M. Nim (*Azadirachta indica*): uma nova alternativa no controle de moscas na pecuária. **Revista Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 293-298, 2008.

DEMIRCI, F.; MUSTU, M.; KAYDAN, M.B.; ÜLGENTÜRK, S. Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 337-342, 2011a.

DEMIRCI, F.; MUSTU, M.; KAYDAN, M.B.; ÜLGENTÜRK, S. Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. **Phytoparasitica**, v. 39, p. 353-360, 2011b.

DHARMAGADDA, V.S.S.; NAIK, S.N., MITTAL, P.K., VASUDEVAN, P. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1235-1240, 2005.

DIODATO, L.; ITURREL, M.; PAZI, M.E. Espécies de *Dactylopius* en Argentina factores que incidem en su producción. **Quebracho - Revista de Ciencias Forestales**, v. 11, p. 67-72, 2004.

DOBERSKI, W.J. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the Elm Bark Beetle *Scolytus scolytus*: pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces*

farinosus to larvae and adults of *Scolytus scolytus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 33, p. 188-194, 1981.

DOMÍNGUEZ, O. **Origem e introdução da palma forrageira no Nordeste**. Recife: Instituto Joaquim Nabuco de Pesquisas Sociais, 1963. 54p.

DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. San Francisco: Editora IHW-Verlag, 2007. 672p.

DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; ARAÚJO FILHO, J.T.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; SANTOS, D.C.; PASSOS, R.A.S. Adubação mineral no crescimento e composição mineral da palma forrageira clone IPA 20. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, p. 129-135, 2010.

DUBOIS, T.; LUND, J.; BAUER, L.S.; HAJEK, A.E. Virulence of entomopathogenic hypocrealean fungi infecting *Anoplophora glabripennis*. **BioControl**, v. 53, p. 517-528, 2008.

ELEOTÉRIO, E.S.R.; BERTI-FILHO, E. Levantamento e identificação de cupins (Insecta: Isoptera) em área urbana de Piracicaba. **Ciência Florestal**, v. 10, p. 125-139, 2000.

ENNOURI, M.; FETOUI, H.; BOURRET, E.; ZEGHAL, N.; ATTIA, H. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1382-1386, 2006.

ERTHAL JUNIOR, M. Controle biológico de insetos pragas. In: SIMPÓSIO MOSAICO AMBIENTAL: OLHARES SOBRE O MEIO AMBIENTE, 1., 2011, Campos dos Goytacazes/RJ. **Anais ...** Campos dos Goytacazes/RJ: IFF, 2011. p. 1-16.

FALCÃO, H.M.; OLIVEIRA, M.T.; MERGULHÃO, A.C.; SILVA, M.V.; SANTOS, M.G. Ecophysiological performance of three *Opuntia ficus-indica* cultivars exposed to carmine cochineal under field conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 419-424, 2013.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE, 2001. 216p.

FARIAS, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual

e perspectivas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, p. 18-21, 2001.

FLORES-FLORES, V.; TEKELENBURG, A. Produção de corante Dacti (*Dactylopius coccus*). In: FAO (Ed.). **Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, cap. 18, p. 169-183, 2001.

FLORES-HERNÁNDEZ, A.; MURILLO-AMADOR, B.; RUEDA-PUENTE, E.O.; SALAZAR-TORRES, J.C.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J.L.; TROYO-DIÉGUEZ, E. Reproduction of wild cochineal *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 77, p. 97-102, 2006.

FONTES, L.R.; MILANO, S. Termite pests and their control in urban Brazil. **Sociobiology**, v. 40, p. 163-177, 2002.

FREITAS, A.C.C.; XIMENES, N.C.A.; AGUIAR, J.S.; NASCIMENTO, S.C.; LINS, T.U.L.; MAGALHÃES, L.R.; COELHO, C.B.B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M.T.S. Biological activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz pod preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 5141-5147, 2012.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A.R.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. 920 p.

GAMS, W.; HODGE, K.T.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. **Proposal to conserve the name *Isaria* Pers.**: Fr. Taxon: in press, 2005.

GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga*. **Revista Técnico - Científica de Citrucultura**, v. 26, p. 1-10, 2005.

GAZAL-SILVA, V.S.; ROSA, P.; LANUNCE, D. VIANA-BAILEZ, A.M.; BAILEZ, O. Preferência de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) por madeiras específicas.

In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22, 2008., Uberlândia/MG. **Anais...** Uberlândia/MG: On-line, 2008.

GHINI, R.S.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 87 p.

GÓES, G.B.; NERI, D.K.P.; CHAVES, J.W.N.; MARACAJÁ, P.B. Efeito de extratos vegetais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Caatinga**, v. 16, p. 47-49, 2003.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos de Meliáceas sobre o parasitóide de ovos de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 607-612, 2004.

GORLACH-LIRA, K.; LIRA, B.B. Utilização do óleo nim para o controle da cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) em palma-forrageira. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 16, p. 18-22, 2011.

GRAVENA, S.; BENVENGA, S.R. Manual Prático de Manejo de Pragas do Tomate. Jaboticabal: Gravena Ltda, 2003. 143p.

GUIRADO, N.; AMBROSANO, E.J.; ARÉVALO, R.A.; ROSSI, F.; MENDES, P.C.D.; AMBROSANO, G.M.B. Controle da cochonilha escama-farinha em citros com o uso de óleos em pulverização. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 24, p. 239-335, 2003.

GUIRADO, N.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; DIAS, F.L. Controle de cupins de montículo com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 23-26, 2009.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I.M.; DEL RÍO, J.C. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 81-87, 2008.

GUZMÁN, A.L.V. **Evaluacion de la actividad inseticida de extractos botánicos para el control**

de *Cactoblastis cactorum* Berger y *Dactylopius* spp. em *Opuntia* spp. (Nopal). 2007. 110f. Tese (Posgrado en Ciencias en Procesos Biotecnológicos). Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México, 2007.

HANEL, H.A. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok (Fungi Imperfect) against the *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). **Zeitschrift Angewandte Entomologie**, v. 92, p. 9-18, 1981.

HANEL, H.A. Selection of a fungus species, suitable for the biological of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). **Zeitschrift Angewandte Entomologie**, v. 94, p. 237-245, 1982.

HARTING, M.P. Recherches sur a nature et les causes de la maladie des pommes de terre en 1845. **Nieuwe Wetensch**, v. 12, p. 203-297, 1846.

HASAN, W.A.; ASSAF, L.H.; ABDULLAH, S.K. Occurrence of entomopathogenic and other opportunistic fungi in soil collected from insect hibernation sites and evaluation of their entomopathogenic potential. **Bulletin of the Iraq Natural History Museum**, v. 12, p.19-27, 2012.

HAYDEN, T.P.; BIDOCHKA, M.; KHACHATOURIANS, G.G. Entomopathogenicity of several fungi toward the english grain aphid (Homoptera: Aphididae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 58-64, 1992.

HENDEE, E. The association of the termites, *Kaloterms minor*, *Reticulitermes hesperus* e *Zootermopsis augusticollis* with fungi. **University of California Publications in Zoology**, v. 39, p. 111-134, 1933.

HODGE, K.T.; GAWS, W.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFER, K.A. Lectotypification and status of *Isaria*: Fr. Taxon:in press, v. 54, 485-489, 2005.

HOFFMANN, W. Etnobotânica. In: FAO (Ed.). **Agroecologia, cultivos e uso da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, 1995. cap. 2, p. 12-14.

HOFFMANN, J.H.; MORAN, V.C.; ZIMMERMANN, H.G. Integrated management of *Opuntia stricta* (Haworth) (Cactaceae) in South Africa: an enhanced role for two, renowned, insect agents.

African Entomology Memoir, v. 1, p. 15-20, 1999.

HOLT, J.A.; LEPAGE, M. Termites and soil properties. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGADHI, M. (Eds.). **Termites, evolution, sociality, symbiosis, ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.389-407, 2000.

HOY, M.A.; SINGH, R.; ROGERS, M.E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 93, p. 24-32, 2010.

IRISH, G.M. Agaves, Yuccas, and related plants: a gardener's guide. Oregon: Timber Press, 2000. 163 p

KAMBHAMPATI, S.; EGGLETON, P. Taxonomy and phylogeny of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.; HIASHI, M. (Eds.). **Termites: volution, sociality, symbioses, ecology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 1-23.

KARAHROODI, R.Z.; MOHARAMIPOUR, S.; FARAZMAND, H.; KARMZADEH-ESFAHANI, J. Effect of eighteen plant essencial oils on nutritional indices of larvae *Plodia interpuctella* Hubner (Lep., Pyralidae). **Journal of Entomological Research**, v. 1, p. 209-219, 2009.

KIM, J.; JE, Y.; ROH, J. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 419-423, 2010.

KIRAN, R.S.; BHAVANI, K.; DEVI, S.P.; RAO, R.B.R.; REDDY, J.K. Composition and larvicidal actividad of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioesource Technology**, v. 97, p. 2481-2484, 2006.

LACEY, L.A.; LIU, T.X.; BUCHMAN, J.L.; MUNYANEZA, J.E. GOOLSBY, J.A.; HORTON, D.R. Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. **Biological Control**, v. 56, p. 271-278, 2011.

LAI, P.Y.; TAMASHIRO, M.; FUJII, J.K. Pathogenicity of six strains of entomopathogenous fungi

to *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 1-5, 1982.

LANG, G.; BLUNT, J.W.; CUMMINGS, N.J.; COLE, A.L.J.; MUNRO, M.H.G. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate de *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 810-811, 2005.

LARCERDA, C.A.; SANTOS, V.F.; BORGES, L.S.; SANTOS, E.A.; COSTA, E.K.S.L.; SILVA-FILHO, C.A.T.; AQUINO, R.E. ATAÍDE, M.; SILVA, D.M.P. Utilização de produtos alternativos para o controle da cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) em palma forrageira. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 16, p. 31-41, 2011.

LAZZARINI, G.M.J. **Efeito da umidade sobre a germinação *in vitro* de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans***. 2005. 46p. Dissertação (Pós-Graduação em Parasitologia) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

LE HOUÉROU, H.N. The role of *Opuntia cacti* in the agricultural development of Mediterranean arid zones. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PRICKLY PEAR AND COCHINEAL, 2., 1992, Santiago, Chile, **Proceedings...**, Santiago, 1992, p. 22-25.

LEITE, S.P.; VIERA, J.R.C.; MEDEIROS, .L.; LEITE, R.M.P.; LIMA, V.L.M.; XAVIER, H.S.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa* evidence-based complementary and antenative medicine. **Oxford University Press**, v. 3, p. 261-265, 2006.

LEITE, A.C.R.; ARAÚJO, T.G.; CARVALHO, B.M.; SILVA, N.H.; LIMA, V.L.M.; MAIA, M.B.S. *Parkinsonia aculeata* aqueous extract fracton: biochemical studies in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 547-552, 2007.

LEWIS, G.P. Tribo Caesalpinieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. (Eds.). **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. p.127-161.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CHÁVEZ-FLORES, O.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A.; SKODA, S.R.; REYES-MARTÍNEZ, G.; BARBA-REYNOSO, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; RUÍZ-AGUILAR, G.M.L.; FOSTER, J.E. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to

control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 32, p. 39-44, 2012.

LIMA, R.M.B.; FERREIRA, M.A.; BRASIL, L.H.A.; ARAÚJO, P.R.B.; VERÁS, A.S.C.; SANTOS, D.C.; CRUZ, M.A.O.M.; MELO, A.A.S.; OLIVEIRA, T.N.; SOUZA, I.S. Substituição do milho por palma forrageira: comportamento ingestivo de vacas mestiças em lactação. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, p. 347-435, 2003.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; VEIRA, S.S.; MELO, B.A.; FILGUEIRA, C.C. Composição de óleos essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.: Avaliação de efeito repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, p. 1-6, 2008.

LIMA, G.; SANTOS, A.C.S.; OLIVEIRA, L.G.; COSTA, A.F.; LOPES, R.S. Avaliação do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. sobre adultos de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX , 12., 2012 , Recife, Brasil, **Anais ...**, Recife, 2012.

LOIOLA, M.I.B.; PATERNO, G.B.C.; DINIZ, J.A.; CALADO, J.F.; OLIVEIRA, A.C.P. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso-RN. **Revista Caatinga**, v. 23, p. 59-70, 2010.

LOPES-LLORCA, L.V.; CARBONELL, T.; GOMEZ-VIDAL, S. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. **Mycological Progress**, v. 1, p. 249-256, 2002.

LOPES, E.B.; BRITO, C.H.; ALBUQUERQUE, I.C.; BATISTA, J.L. Desempenho do óleo de laranja no controle da cochonilha-do-carmim em palma gigante. **Revista Engenharia Ambiental**, v. 6, p. 252-258, 2009.

LOPES, R.S., PORTELA, A.P.A.S., SVEDESE, V.M., ALBUQUERQUE, A.C., LUNA-ALVES LIMA, E.A. Aspectos morfológicos de *Paecilomyces farinosus* (Holm ex s. f. Gray) Brown & Smith sobre infecção em *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). **Biológico**, v. 70, p. 29-33, 2008.

LOPES, R.S., SVEDESE, V.M., PORTELA, A.P.A.S., ALBUQUERQUE, A.C., LUNA-ALVES LIMA, E.A. Virulência e aspectos biológicos de *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones sobre *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 565-572, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa -Instituto Plantarum, 2002, 162p.

LOUREIRO, E.S.; MOINO JÚNIOR, A. ARNOTI, A.; SOUZA, G.C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v. 31, 263-269, 2002.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 71, p. 35-40, 2004.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus: 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v. 29, p.553-561, 2005.

LOVATTO, P.B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito de extratos das plantas silvestres da família *Solanaceae* sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**, v. 34, p. 971-978, 2004.

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; MANOCH, L.; SAMSON, R.A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycology**, v. 109, p. 581-589, 2005.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W., SANTANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

LYRA, M.C.C.P.; SILVA, D.P.; CASTRO, N.R.; COUTINHO, A.E.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de *Fusarium proliferatum* sobre a cochoilha-do-carmim no semi-árido de Pernambuco. In:

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. p. 557.

MACHADO, R.R.B.; MEUNIER, I.M.J.; SILVA, J.A.A.; CASTRO, A.A.J.F. Árvores nativas para a arborização de Teresina, Piauí. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 1, p. 10-18, 2006.

MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, p. 1675-1689, 2004.

MARTINEZ, S.S. **O Nim *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos e produção**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR, 2002, 142 p.

MASCARIN, G.M.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 753-761, 2010.

MEDINA, P.; BUDIA, F.; DEL ESTAL, P.; VINUELA, E. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, p. 43-50, 2004.

MEDINA, E.M.D.; RODRÍGUEZ, E.M.R.; ROMERO, C.D. Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 103, p. 38-45, 2007.

MEIKLE, W.G.; MERCADIER, G.; ROSENGAUS, R.B.; KIRK, A.A.; DEROUANÉ, F.; QUIMBY, P.C. Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Deuteromycota: Hyphomycetes) obtained from formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 315-322, 2005.

MELO-SANTOS, M.A.V.; MELO-SANTOS, M.A.V.; ARAÚJO, A.P.; RIOS, E.M.M.; REGIS, L. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. **Biological Control**, v. 49, p. 186-191, 2009.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braslian Journal of Plant Pysiology**, v. 14, p. 71-81, 2002.

MENEZES, M.E.L; BRITO, E.S.; MALHEIRO, M.G.; LOPES, A.C.R.; SANTOS, P.S.; GAVA, C.A.T. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Dactylopius opuntiae* Cockerel (Hemiptera: Dactylopiidae) no Semi-Árido nordestino. **Documentos Embrapa Semi-Árido**, v. 2195, p. 83-89, 2008.

MEYER, J.M.; HOY, M.A.; BOUCIAS, D.G. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, 96-102, 2008.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, p. 145-155, 2007.

MEYLING, N.V.; SCHMIDT, N.M.; EILENBERG, J. Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. **Polar Biology**, v. 35, p. 1439-1445, 2012.

MIGLIORINI, P.; LUTINSKI, J.A.; GARCIA, F.R.M. Eficiência de extratos vegetais no controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v. 23, p. 83-89, 2010.

MILANO, S.; FONTES, L.R. **Cupim e Cidade: Implicações ecológicas e controle**. São Paulo: Edição dos Autores, 2002. 142p.

MILNER, R.J. Application of biological control agents in mound building termites (Isoptera: Termitidae) – experiences with *Metarhizium anisopliae* in Australia. **Sociobiology**, v. 41, p. 419-428, 2003.

MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; LUTTON, G.G. The effect of humidity on germination and infection of termites by Hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 64-69, 1997.

MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; LUTTON, G.G. The selection of an isolate of the Hyphomycetes fungus *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. **Biological Control**, v. 11, p. 240-247, 1998.

MOINO JÚNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V.H.P. (Ed.). **Controle Biológico de Pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2000, p. 186-193.

MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, S.B. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 611-619, 1998.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, p. 139-148, 2005.

NAKAMURA, E.L.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* Mart and related compounds. **Cancer Letter**, v. 177, p. 119-124, 2002.

NEFZAOUI, H., BEN SALEM, A. *Opuntia* spp.: a strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the Wana region. In: MONDRAGÓN-JACOBO, C., PÉREZ-GONZÁLEZ, S. (Eds.). **Cactus (*Opuntia* spp.) as forage**. Rome: FAO-Plant production and protection paper, 2001, p. 73-90.

NETO, I.L.C.; MARTINS, F.M. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Agavaceae). **Revista Caatinga**, v. 25, p. 72-78, 2012.

NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, v. 33, p.51-56, 2004.

NOBEL, P.S. Ecophysiology of *Opuntia ficus-indica*. In: MONDRAGÓN-JACOBO C, PÉREZ-GONZÁLEZ, S. (Eds.) **Cactus (*Opuntia* spp.) as forage**. Rome: FAO- Plant production and protection paper, 2001, p. 13-20.

OLIVEIRA, M.A.P. **Composição de comunidades termíticas em áreas de cana-de-açúcar em fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco**. 2011. 87f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola), Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, Y.L.; SILVA, M.V. levantamento etnobotânico e caracterização de plantas com potencial medicinal do semi-árido de Pernambuco. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 19., 2011, Recife, Brasil, **Anais...** Recife: <http://www.ufpe.br/propesq/images/conic/2011/ANAIS.swf>, 2011.

OMENA, M.C., NAVARRO, D.M.A.F., PAULA, J.E., LUNA, J.S., LIMA, M.R.F.; SANTANA, A.E.G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

ONOFRE, S.B.; VARGAS, L.R.B.; ROSSATO, M.; BARROS, N.M.; BOLDO, J.T.; NUNES, A.R.F.; AZEVEDO, J.L. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. cap. 10, p. 295-317.

OSBORNE, L.S. Biological control of whiteflies and other pests with a fungal pathogen. United States Patent. 4.942.030, 1990.

PAES, J.B.; MELO, R.R.; LIMA, C.R; OLIVEIRA, E. Resistência natural de sete madeiras ao cupim subterrâneo (*Nasutitermes corniger* Motsch.) em ensaio de preferência alimentar. **Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 57-62, 2007.

PAIVA, P.M.G.; SANTANA, G.M.S.; SOUZA, I.F.A.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; AGRANETO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. Effect of lectins from *Opuntia ficus-indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.

PALACIOS-MENDOZA, C.; NIETO, R.; LLANDERL, C.; GONZÁLEZ, H. Efectividad biológica de productos biodegradables para el control de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae). **Acta Zoológica Mexicana**, v. 20, p. 99-106, 2004.

PARKER, B.L.; SKINNER, M.; COSTA, S.D.; GOULI, S.; REID, W.; BOUHSSINI, M.E. Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): collection and characterization for development. **Biological Control**, v. 27, p. 260-272, 2003.

PASSOS, E.M. **Patogenicidade de fungos do gênero *Isaria* (Persoon) sobre *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae) e aspectos imunológicos**. 2008. 43f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola), Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Univeridade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

PELIZZA, S.A.; ELIADES, L.A.; SAPARRAT, M.C.N.; CABELLO, M.N.; SCORSETTI, A.C.; LANGE, C.E. Screening of Argentine native fungal strains for biocontrol of the grasshopper *Tropidacris collaris*: relationship between fungal pathogenicity and chitinolytic enzyme activity. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1359-1366, 2012.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; DUDA, M. Efeito de extratos de madeiras de quatro espécies florestais em cupins *Nasutitermes* sp. (Isoptera, Termitidae), **Scientia Forestalis**, v. 71, p. 51-54, 2006.

PESSOA, A.S. **Cultura de plama forrageira**. Recife: Sudene, 1967. 98 p.

PIZARRO, A.P.B.; FILHO, A.M.O.; PARENTE, J.P.; MELO, M.T.V.; SANTOS, C.E.; LIMA, P.R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da**

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, p. 23-29, 1999.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. **Árvores de Manaus**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 1975. 312p.

PRENEROVÁ, E. Pathogenicity of *Paecilomyces farinosus* toward *Cephalcia abietis* eonymphs (Insecta: Hymenoptera): Enhancement of bioactivity by *in vivo* passaging. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 62-64, 1994.

PRENEROVÁ, E. Accelerated germination by aeration: a novel method of preparation of germinated blastosporos of *Paecilomyces farinosus* for practical application. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 225-229, 1995.

PRESTWICH, G.D.; GUSCH, T.J.; BENTLEY, B.L. THORNE, B.L. Chemical variation in defensive secretions of four species of *Nasutitermes*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 13, p. 329-336, 1985.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 443 p .

QUEIROZ, L.P. New combinations in *Libidibia* (Dc.) Schltdl., and *Poiciaella* Britto & Rose (Legumiosae, Caesalpiioideae). **Neodiversity**, v. 5, p. 11-12, 2010.

RATH, A.C. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. **Biological Science and Technology**, v. 10, p. 563-581, 2000.

RATH, A.C.; TIDBURY, C.A. Susceptibility of *Coptotermes acinaciformis* (Isoptera: Rhinotermitidae) and *Nasutitermes exitiosus* (Isoptera: Temitidae) to two commercial isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Sociobiology**, v. 28, p. 67-72, 1996.

RIBEIRO, M. 2009. **Pesquisa desenvolve tecnologias para o controle da cochonilha-do-carmim em palma**. Disponível em<<http://www.campoecriacao.com.br/site/index.php?p=noticia&id=9299>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições, 1995. 248p.

RODRIGUES, M.S.; SILVA, R.C.M.; SECCO, E.S. Caesalpinieae (Leguminosae-Caesalpinioideae) do Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, Município de Moju, PA, Brasil. **Hoehnea**, v. 39, p. 489-516, 2012.

ROPEK, D.; PARA, A. The effect of heavy metal ions and their complexions upon growth, sporulation and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 12, p. 227-230, 2003.

ROSENGAUS, R.B.; LEFEBVRE, M.L.; TRANIELLO, J.F.A. Inhibitory of fungal spore germination by *Nasutitermes*: Evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 21-39, 2000.

SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.; GOMES, F.S.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; LUANA C.B.B.; COELHO, L.C.B.B.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.

SÁ, R.A.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; MELO, C.M.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; COELHO, L.C.B.B.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 470-477, 2009.

SALES, M.J.D.; MATOS, W.C.; REIS, Y.T.; RIBEIRO, G.T. Frequência e riqueza de cupins em áreas de plantio de eucalipto no litoral norte da Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p. 1351-1356, 2010.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, v. 6, p. 1-119, 1974.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; PAUL-LATGE, J. Taxonomy of entomopathogenic fungi. In:

SAMSON, R.A. (Ed.). **Atlas of Entomopathogenic Fungi**. Belin: Springer-Verlag, 1988. p. 5-16.

SANCHEZ-PEÑA, S.R. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. **Biocontrol**, v. 45, p. 63-78, 2000.

SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SANTA-CECÍLIA, F.V.; PEDROSO, E.C.; SOUSA, M.V.; ABREU, F.A.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, G.A. Extratos de plantas no controle de *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) em cafeeiro. **Coffe science**, v. 5, p. 283-293, 2010.

SANTANA, A.L.B.D.; MARANHÃO, C.A.; SANTOS, J.C.; CUNHA, F.M.; CONCEIÇÃO, G.M.; BIEBER, L.W.; NASCIMENTO, M.S. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 7-12, 2010.

SANTIAGO, G.P.; PÁDUA, L.E.M.; SILVA, P.R.R.; CARVALHO, E.M.S.; MAIA, C.B. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciências Agrotécnica**, v. 32, p. 792-796, 2008.

SANTOS, G.F. **Ação de *Paecilomyces lilacinus* e *Paecilomyces farinosus* sobre teleóginas de *Boophilus microplus***. 2003. 51f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos), Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

SANTOS, D.C.; FARIAS, I.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; ARRUDA, G.P.; COELHO, R.S.; DIAS, F.M.; MELO, J.N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 2006, 48p. (IPA, Documentos, 25).

SANTOS, J.D.G.; BRANCO, A.; SILVA, A.F.; PINHEIRO, C.S.R.; NETO, A.G.; UETANABARO, A.P.T.; QUEIROZ, S.R.O.D.; OSUNA, J.T.A. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African**

Journal of Biotechnology, v. 8, p. 6181-6184, 2009.

SANTOS, A.B.S.; SILVA, T.F.B.; SANTOS, A.C.; PAIVA, L.M.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Efeito fungitóxico do óleo de Nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Revista Caatinga**, v. 22, p. 17-22, 2009.

SANTOS, J.D.G.; ESPELETA, A.F.; BRANCO, A.; ASSIS, S.A. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1997-2001, 2013.

SAUSEN, C.D.; RIBEIRO, L.P.; FERREIRA, F.; RIGO, D.S.; CÂMARA, C.; STURZA, V.; SOARES, D.S.B. Ação de plantas inseticidas sobre a oviposição e eclosão de larvas de *Eriopsis connexa* (Col.: Coccinellidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, 1247-1250, 2007.

SAXENA, R.C. Insecticides from Neem. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Eds.). **Insecticides of plant origin**. Washington: ACS, 1989. cap. 9, p. 110-129.

SAXENA, R.C. **Scope of nim for developing countries**. Paper presented at World Nim Conference Souvenir – Bangalore: Nairobi. 1993 p. 24-28.

SCHEFFRAHN, R.H.; CABRERA, B.J.; KERN JR.; W.H., SU, N.Y. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. **Florida Entomologist**, v. 85, p. 273-275, 2002.

SCHLÜTER, M.A. **Avaliação de extratos vegetais no controle de *Annticarsia gemmantalis* Hübner, 1818 (Lepdoptera: octuidae) sobre diferentes pressões populacionais a campo**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Pós-Graduação em Agromomia, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SCHMUTTERER, H. **The neem tree *Azadirachta indica*. A Juss. and meliaceous plants**, Weinheim: VCH, 1995. 696 p.

SCORSETTI, A.C.; HUMBER, R.A.; DE GREGÓRIO, C.; LASTRA, C.C.L. New records of

entomopathogenic fungus infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* pests of horticultural crops in Argentina. **BioControl**, v. 53, p. 787-796, 2008.

SEVIM, A.; DEMIR, I.; HÖFTE, M.; HUMBER, R.A.; DEMIRBAG, Z. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. **BioControl**, v. 55, p. 279-297, 2010.

SHEINVAR, L. Taxonomia das opuntias utilizadas. In: FAO (Ed.). **Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, 2001, cap. 3, p. 20-27.

SILVA, O.R.R.F.; BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1999. 205p.

SILVA, F.; CAVALCANTE, C.; CARVALHO, L. 2006. **Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes**. Disponível em <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html>>. Acesso em: 01 set. 2010.

SILVA, C.S.; NUNES, P.O.; MESCOUTO, C.S.T.; MÜLLER, R.C.S.; PALHETA, D.C.; FERNANDES, K.G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 751-754, 2010.

SILVA, J.O.F; GODOY, K.B.; GAZAL,V.; EGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B. Ocorrência de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) em áreas urbanas e suburbanas do município de Cruzeiro do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24., 2012, Curitiba. **Anais...** Curitiba: On-line, 2012.

SIMPSON, B.B.; LARKIN, L.L.; WEEKS, A. Progress towards resolving the relationships of the *Caesalpinia* group (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A (Eds.). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics**. Royal Botanic Gardens: Kew. 2003, p. 123-148.

SIMPSON, B.B., LEWIS, G.P. New combinations in Pomaria (Caesalpinioideae: Leguminosae). **Kew Bulletin**, v. 58, p. 175-184, 2003.

SOARES, C.G.; LEMOS, R.N.S.; CARDOSO, S.R.S.; MEDEIROS, F.R.; ARAÚJO, J.R.G. Efeito de óleos e extratos aquosos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Cymbopogon winterianus* Jowitt sobre *Nasutitermes corniger* Motschulsky (Isoptera: Termitidae). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 50, p. 107-116, 2008.

SOARES, C.S.A.; SILVA, M.; COSTA, M.B.; BEZERRA, C.E.S. Ação inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, p. 154-157, 2011.

SOUZA, M.C.C.; TROVÃO, D.M.B.M. Bioatividade do extrato seco de plantas da Caatinga e do Nim (*Azadirachta indica*) sobre *Sitophilus zeamais* Mots em milho armazenado. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, p. 120-124, 2009.

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v. 59, p.133-137, 2000.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Nova Odessa- Instituto Plantarum. 2005, 639p.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A., CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

SPECHT, A.; AZEVEDO, J.L.; LUNA-ALVES LIMA, E.A.; BOLDO, J.T.; MARTINS, M.K.; LORINI, L.M.; BARRROS, N.M. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell- Jones (Fungi, Sordariomycetes) em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, p. 493-494, 2009.

SUKUMAR, K.; PERICH, M.J.; BOOBAR, L.R. Botanical derivatives in mosquito control: a

review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, p. 210-237, 1991.

SUN, J.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and *in vitro*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, p. 78-85, 2002.

SUN, J.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, p. 38-46, 2003.

TAKOV, D.I.; DOYCHEV, D.D.; LINDE, A.; DRAGANOVA, S.A.; PILARSKA, D.K. Pathogens of bark beetles (Curculionidae: Scolytinae) and other beetles in Bulgaria. **Biologia**, v. 67, p. 966-972, 2012.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; PADULA, L.F.L. Toxicidade de produtos fitossantários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 89-96, 2002.

TATE, P. Notes on the genera *Ectomyes* and *Termitaria*, fungi parasitic on termites. **Parasitology**, v. 81, p. 77-78, 1928.

TAVARES, M.G.C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* MOTS.,1855 (COL.: Curculionidae)**. 2002. 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

THOMAZINI, A.P.B.W.; VENDRAMIM, J.D.; LOPES, M.T.R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 13-17. 2000.

TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C. O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. **Alta Floresta**, v. 2, p. 40-51, 2003.

TORRES, A.L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J.V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 151-156, 2001.

TOSCANO, L.C.; SCHLICK-SOUZA, E.C.; MAMORÉ, G.L.; MARTINS, G.; SOUZA-SCHLICK, D.; MARUYAMA, W.I.T. Controle do cupim de montículo (Isoptera: Termitidae) de pastagem com fungos entomopatogênicos. **Revista Caatinga**, v. 23, p. 6-11, 2010.

TULASNE, M.L.R. Légumineuses arborescentes de l'Amérique du Sud. **Archives du Muséum D'Histoire Naturelle**, v. 4, p. 123-170, 1884.

VANEGAS-RICO, J.M.; LOMELI-FLORES, J.R.; RODRÍGUEZ-LEYVA, E.; MORA-AGUILERA, G.; VALDEZ, J.M. Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 415-433, 2010.

VASCONCELOS, A.G.V.; LIRA, M.A.; CAVALCANTI, V.A.L.; SANTOS, M.V.F.; CÂMARA, T.; WILLANDINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 28-31, 2006.

VASCONCELOS, A.G.V.; LIRA, M.A.; CAVALCANTI, V.A.L.B. Seleção de clones de palma forrageira resistente à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 827-831, 2009.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2002.

VIGUEIRAS, A.L.; TOVAR, J.C.; PELAYO-ORTIZ, C. Use of botanicals extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on Cactus Pear. **Acta Horticulture**, v. 811, p. 299-234, 2009.

VIERA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M.W. Inseticida de origem vegetal. In: FERREIRA, J.T.B.; CORREA, A.G.; VIEIRA, P.C. (Eds.) **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: EduFSCAR, 2001. 176 p.

VILAS-BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arquivos de**

Biologia e Tecnologia, v. 35, p. 749-761, 1992.

VILELA, M.S.; FERREIRA, M.A.; AZEVEDO, M.; MODESTO, E.C.; FARIAS, I; GUIMARÃES, A.V.; BISPO, S.V. Effect of processing and feeding strategy of the spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) for lactating cows: Ingestive behavior. **Applied Animal Behaviour Science**, v., p. 1-8, 2010.

VOLCHANSKY, C.R.; HOFFANN, J.H.; ZIMMERMAN, H.G. Host-plant affinities of two biotypes of *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae) enhanced prospects for biological control of *Opuntia stricta* (Cactaceae) in South Africa. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, p. 85-9, 1999.

XIMENES, N.C.A. **Purificação e caracterização da lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL): aplicação biológica**. 2004, 57f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004,

XU, D.; ALI, S.; HUANG, Z. Insecticidal activity influence of 20-Hydroxyecdysone on the pathogenicity of *Isaria fumosorosea* against *Plutella xylostella*. **Biological Control**, v. 56, p. 239-244, 2011.

WANG, C.; POWELL, J.E. Isolation and evaluation of *Beauveria bassiana* of control of *Coptotermes formosanus* and *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**, v. 41, p. 248-255, 2003.

WANG, C.; POWELL, J.E. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Biological Control**, v. 30, p. 523-529, 2004.

WARUMBY, J.F.; ARRUDA FILHO, G.P.; ARRUDA, C.M.F. Produção de carmim de cochonilha. In: MENEZES, R.S.C.; SIMÕES, D.A.; SAMPAIO, E.V.S.B. (Eds). **A palma no nordeste do Brasil – Conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Editora Universitária – UFPE, p. 223-237, 2005.

WRAIGHT, P.S.; CARRUTHERS, R.I.; WRAIGHT, G. Pathogenicity of the entomopathogenic

fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 217-226, 1998.

WRIGHT, M.S.; OSBRINK, W.L.A.; LAX, A.R. Transfer of entomopathogenic fungi among formosan subterranean termites and subsequent mortality. **Journal Applied Entomology**, v. 126, p. 20-23, 2002.

WRIGHT, M.S.; CONNICK, W.J.; JACKSON, M.A. Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951, 2003.

WRIGHT, M.S.; RAINA, A.K.; LAX, A.R. A strain of the fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling subterranean termites. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 1451-1458, 2005.

YANAGAWA, A.; SHIMIZU, S. Resistance of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki to *Metarhizium anisopliae* due to grooming. **Biocontrol**, v. 52, p. 75-85, 2007.

YANG, S.; ZHUANG, H.; LI, Y.; KUANG, R. Insecticidal efficacy of *Isaria farinosa* in different life stages of *Pissodes puctatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 321-325, 2009.

ZIMMERMANN, H.G.; MORAN, V.C. Biological control of prickly pear, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae), in South Africa. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v; 37, p. 29-35, 1991.

ZORZENON, F.J.; JUSTI JÚNIOR, J.; POTENZA, M.R.; CAMPOS, T.B.; CA NCELLO, E.M. Cupins. Pragas em áreas urbanas. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, v. 18, p. 4-66, 2006.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPÍTULO II: ARTIGO 1

Potencial bioinseticida de *Isaria* spp. no controle biológico de *Nasutitermes corniger* e *Dactylopius opuntiae*

Artigo a ser submetido ao periódico Biological Control

Fator de Impacto: 1.873

Potencial bioinseticida de *Isaria* spp. no controle biológico de *Nasutitermes corniger* e *Dactylopius opuntiae*

Rosineide da Silva Lopes¹, Geiziquele de Lima², Antonio Félix da Costa², Maria Tereza dos Santos Correia¹, Elza Áurea de Luna Alves Lima^{3*}, Vera Lúcia de Menezes Lima^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil.

² Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martins, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Micologia – CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Brasil.

* Autor para correspondência: Fax: +55 81 2126-8540

E-mail: lima.vera.ufpe@gmail.com e elza.aurea@gmail.com

Resumo

Os insetos *Nasutitermes corniger* e *Dactylopius opuntiae* são pragas severas encontradas no Brasil e no mundo, os quais infestam áreas urbanas e agrícolas, respectivamente. O uso de inseticidas químicos no controle desses insetos pode comprometer o ambiente, a saúde humana e de outros animais. O objetivo deste trabalho foi analisar a ação dos fungos entomopatogênicos *Isaria farinosa*, *Isaria fumosorosea* e *Isaria javanica* sobre *N. corniger* e *D. opuntiae*, bem como avaliar o efeito sinérgico dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin sobre os aspectos biológicos dos fungos, visando à utilização em conjunto destes com as espécies de *Isaria* no controle Integrado de insetos-praga. Os resultados mostraram que os fungos foram patogênicos a *N. corniger*, sendo *I. farinosa* ESALQ1355 mais eficiente, causando a morte de 95% dos operários (CL_{50} $6,66 \times 10^4$ conídios/mL) e 85% dos soldados (CL_{50} $6,81 \times 10^4$ conídios/mL). Contudo nenhum dos fungos foi eficiente contra *D. opuntiae*. Apenas os inseticidas Acetamiprid e Thiamethoxan foram compatíveis com os fungos, sendo possível testar o uso destes em conjunto com linhagens de *Isaria* no controle de *D. opuntiae*. Os resultados obtidos em laboratório sugerem que as linhagens de *Isaria*, em especial, *I. farinosa* ESALQ1355, possuem potencialidade para o controle de *N. corniger*.

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, cochonilha-do-carmim, cupim arborícola, inseticidas.

1. Introdução

Nasutitermes corniger (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) é um cupim arborícola, de distribuição ampla nas Américas, e ocorre desde o Sul do México até o Norte da Argentina, sendo considerada a praga mais importante em áreas urbanas do Brasil e em boa parte da América do Sul, responsável por enormes danos a peças de madeira (Constantino, 2002; Milano e Fontes, 2002; Torales, 2002). A dispersão desse cupim também abrange o Sul da Florida e as Ilhas Virgens, nos Estados Unidos e o território das Bahamas e da Nova Quiné (Scheffrahn et al., 2002; Scheffrahn et al., 2003; Scheffrahn et al., 2005; Scheffrahn et al., 2006). *N. corniger* é a mais comum e importante praga do gênero *Nasutitermes*, sendo encontrado em todo o território brasileiro, causando riscos permanentes em edifícios históricos e suas coleções de objetos e documentos antigos, além das construções urbanas e árvores ornamentais (Milano e Fontes, 2002).

A cochonilha-do-carmim, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae) é utilizada em alguns países como Peru, Ilhas Canárias e México para a produção do corante carmim, usado na indústria alimentícia e, para o controle biológico de algumas cactáceas invasoras (Hoffmann et al., 1999; Volchanski et al., 1999). Várias espécies de *Opuntia* são parasitadas por *D. opuntiae*, incluindo *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller e *Opuntia cochenillifera* (L.) (Chaves-Moreno et al., 2009). Esse inseto ameaça as cultivares de palma na África do Sul, Brasil e México, causando perdas na produção de forragem e dos frutos, ocasionando enormes prejuízos econômicos aos agricultores e pecuaristas (Brutsch e Zimmermann, 1993; Santos et al., 2006; Vigueras et al., 2009).

Opuntia ficus-indica é uma cactácea importante na economia agrícola das regiões áridas e semiáridas do mundo, devido à sua adaptação fisiológica à escassez de água e ao seu potencial em produzir grandes quantidades de forragens verdes, suculentas, mesmo sob condições desfavoráveis (Nobel, 2001; Griffith, 2004). Essa cactácea é composta por carboidratos solúveis, cálcio e vitaminas e apresenta ótima palatabilidade e um alto teor de mucilagem e umidade que a torna fonte de água potável para os animais das regiões áridas e semiáridas (Le Houérou, 1996; Ben Salem et

al., 2002), sendo utilizada como forragem para animais e na alimentação humana em países como México, Brasil, Bolívia, Chile, Estados Unidos, Portugal, Itália e em países do Oriente Médio (Nobel, 2001). No Nordeste do Brasil, *O. ficus-indica* é utilizada como forragem para os animais da bacia leiteira, sendo cultivados cerca de 500 mil hectares, dos quais o Estado de Pernambuco e Alagoas conta com 150 mil hectares, representando 50% dos pastos cultivados (Nobel, 2001; Santos et al., 2006).

O uso de inseticidas químicos no controle de pragas apresenta resultados imediatos, contudo o seu emprego sem orientação agrônômica pode ocasionar danos ao homem e ao meio ambiente. Uma alternativa a ser testada para o controle biológico de *N. corniger* e de *D. opuntiae* é o uso de agentes entomopatogênicos, como os fungos. O gênero *Isaria* inclui importantes patógenos de insetos e são usados no controle de várias pragas. *Isaria farinosa* (Holm: Fries) Fries é uma espécie entomopatogênica cosmopolita, cuja eficiência é comprovada para *Sitophilus orzae* L. (Dal-Bello et al., 2001), *Anoplophora glabripennis* Motschulsky (Dubois et al., 2008), *Planococcus citri* (Risso) (Demirci et al., 2011a), entre outros. *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith tem sido isolado de uma variedade de insetos (Osborne, 1990), sendo sua patogenicidade comprovada no controle de *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring), *Diaphorina citri* Kuwayama e *Coptotermes formosanus* (Shiraki), (Meikle et al., 2005; Lezama-Gutiérrez et al., 2012; Wright e Alan, 2013). *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones, é um entomopatógeno testado no controle de insetos-praga, como os cupins *C. formosanus* e *Reticulitermes flavipes* (Kollar) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Wright et al., 2003; Lopes et al., 2011), além de ser isolado de diferentes espécies de insetos como *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Scorsetti et al., 2008).

Portanto, considerando os diversos prejuízos econômicos causados por *N. corniger* e *D. opuntiae* é importante à busca por novas alternativas economicamente viáveis e de baixa toxicidade no controle desses insetos. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial dos fungos entomopatogênicos *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* no controle de *N. corniger* e *D. opuntiae*. Além disso, foi avaliado o efeito dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e

Lambacyhalothrin sobre os aspectos biológicos dos fungos, tais como crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios.

2. Material e Métodos

2.1 *Nasutitermes corniger* e *Dactylopius opuntiae*

O cupim *N. corniger* foi coletado de cupinzeiros localizados no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), estado de Pernambuco/Brasil. A espécie foi identificada no Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Brasil. Após identificação, os operários e os soldados selecionados e com o mesmo estágio de desenvolvimento foram usados nos bioensaios.

A cochonilha *D. opuntiae* foi coletada em plantações de *O. fícus-indica* no Sertão do Moxotó e do Pajeú, no estado de Pernambuco/Brasil. A criação do inseto foi realizada em sala climatizada a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo os cladódios da palma sadios infestados com ninfas de primeiro estágio e colocados horizontalmente sobre estantes de madeira. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, após 12 e 40 dias de infestação, respectivamente. As palmas com as fêmeas adultas foram pulverizadas previamente com uma solução de detergente neutro a 2% para retirar o excesso de cera do corpo do inseto, visando o melhor contato das suspensões dos fungos testados.

2.2 As espécies de *Isaria* utilizadas nos bioensaios

Foram testadas oito linhagens de três espécies de *Isaria*. *I. farinosa* (URM5016 e URM5060) e *I. javanica* (URM4993 e URM4995) foram obtidas da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)/Brasil, enquanto *I. farinosa* (ESALQ1205 e ESALQ1355) e *I. fumosorosea* (ESALQ1296 e ESALQ1297) foram cedidas pela Micoteca do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Brasil. A

viabilidade das linhagens foi determinada pelos percentuais de germinação após o reisolamento das mesmas de operários de *N. corniger*. Em seguida, as oito linhagens foram cultivadas em Meio Sabouraud (Peptona-Dextrose-Ágar) por 12 dias e, após esse período, os conídios de cada linhagem foram transferidos para 10 mL de solução Tween 80 (0,1%) e a suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 1×10^8 conídios/mL.

2.3 Ação das linhagens de *Isaria* sobre *Nasutitermes corniger* e *Dactylopius opuntiae*

O efeito dos fungos sobre *N. corniger* foi analisado com base no método de Kang et al. (1990). Discos de papel de filtro (4 cm de diâmetro) foram impregnados com 0,2 mL da suspensão de 1×10^8 conídios/mL de cada linhagem. Os discos foram secos à temperatura ambiente e, em seguida, foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) e adicionado a estas um pedaço de algodão umedecido para manter a umidade, juntamente com um fragmento do cupinzeiro, para servir de abrigo aos insetos. No total, 20 insetos (quatro soldados e 16 operários), proporção indicada por Vasconcellos e Bandeira (2006), foram cuidadosamente transferidos para as placas, mantidos sob temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 80 ± 10 % e na ausência de luz. Os experimentos foram efetuados com cinco repetições, sendo a mortalidade avaliada diariamente até a morte do último inseto.

Para os bioensaios com *D. opuntiae*, palmas infestadas com ninfas e fêmeas adultas foram pulverizadas com 10 mL da suspensão (1×10^8 conídios/mL) de cada linhagem de *Isaria* e da solução Tween 80 a 0,1% (controle), com um pulverizador manual De Vilbiss nº 15. Após a pulverização, as palmas foram colocadas em potes plásticos retangulares, com dimensão aproximada de 30 cm x 15 cm x 8 cm, e mantidas em sala climatizada à temperatura de 26 ± 1 °C. As avaliações foram feitas após 10 dias da aplicação dos tratamentos, em três quadrados de 64 cm^2 (8 cm x 8 cm), com aproximadamente 50 indivíduos cada um. A análise da mortalidade foi realizada em estereomicroscópio, sendo os insetos com modificação na coloração, corpo desidratado, flácido e sem movimentos considerados mortos.

Para confirmação da mortalidade dos insetos pelos fungos testados, estes passaram por um processo de desinfecção em álcool 70 % (dois segundos), solução de hipoclorito de sódio 4 % (três minutos) e em água destilada esterilizada (três minutos), conforme Alves (1998). Em seguida, os insetos foram transferidos para câmara úmida e mantidos em Biological Oxygen Demand (BOD) ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e $80 \pm 10\% \text{UR}$) até a esporulação dos entomopatógenos. As linhagens com percentual de mortalidade a partir de 40% foram consideradas como as de maior patogenicidade e foram selecionadas para avaliação da concentração letal (CL_{50}). Suspensões destas linhagens foram ajustadas para as concentrações de 1×10^4 a 1×10^8 conídios/mL e em seguida pulverizadas, separadamente, sobre os insetos. Após observações diárias, os insetos mortos foram transferidos para câmara úmida e mantidos em BOD ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e $80 \pm 10\% \text{UR}$) para confirmação dos patógenos, sendo os dados de mortalidade confirmada usados para determinar a CL_{50} .

2.4 Efeito dos inseticidas sobre as linhagens de *Isaria*

Os inseticidas químicos Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothri foram selecionados por serem utilizados no controle de insetos da ordem Hemiptera como cochonilhas, e serem disponíveis comercialmente. Os inseticidas foram utilizados em três concentrações preestabelecidas de acordo com as recomendações do fabricante, sendo a concentração média (CMed) aquela recomendada para o uso em campo, a concentração mínima (CMed/2) e a concentração máxima (CMedx2), conforme a Tabela 1. O efeito dos produtos químicos foi avaliado por meio do crescimento vegetativo, esporulação e da germinação dos fungos, cujos ensaios foram realizados em cinco repetições. Para crescimento e esporulação, os inseticidas foram adicionados ao SAB líquido (45°C), nas concentrações mínima, média e máxima, e o meio foi vertido em placas de Petri esterilizadas. Em seguida, discos de 0,3 mm de papel filtro com 0,01 mL da suspensão (1×10^7 conídios/mL) das oito linhagens de *Isaria* foram inoculados em placas de Petri com SAB, acrescidas das concentrações dos inseticidas e sem os produtos químicos (controle), e incubadas em BOD ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e $80 \pm 10\% \text{UR}$) por 12 dias, sendo o crescimento micelial determinado pelo

diâmetro da colônia. Para avaliar a esporulação fúngica, fragmentos dessas colônias foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução Tween 80 (0,1%). A suspensão foi agitada por aproximadamente dois minutos em Vortex e os esporos foram quantificados em câmara de Neübauer. Para avaliação da germinação, os produtos químicos foram adicionados a tubos de ensaio contendo a solução Tween (0,1 %) e a solução Tween sem os inseticidas foi utilizada como controle. Em seguida, 1 mL da suspensão (1×10^8 conídios/mL) das linhagens foi inoculado em 9 mL de solução Tween 80 para a obtenção de suspensões com 1×10^7 conídios/mL, após uma hora, foi inoculado 0,1mL das suspensões, separadamente, em placas de Petri contendo SAB e incubadas em BOD ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e $80 \pm 10 \% \text{UR}$). A germinação foi determinada após 16 horas, por meio da observação de 500 conídios (entre germinados e não germinados), sendo o percentual de germinação calculado pela fórmula ($G = nx100/500$), conforme descrito por Alves (1998).

2.5 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme análise de variância (ANOVA) utilizando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute, 1999-2001). As médias das concentrações letais (CL_{50}) foram determinadas por meio do Proc Probit (SAS Institute 1999-2001).

3. Resultados

Os conídios das linhagens de *Isaria* apresentaram percentuais de germinação superiores a 90%, o que demonstra a capacidade infectiva destas após o reisolamento a partir de operários do cupim (Tabela 2). Os operários e soldados de *N. corniger* foram suscetíveis aos fungos, os quais apresentaram ação patogênica, com média de mortalidade sobre os insetos de 10% a 95% (Tabela 3). *I. farinosa* ESALQ1355 causou a morte de 95% de operários e de 85% dos soldados de *N. corniger* após o 4º dia de avaliação, sendo estes percentuais de mortalidade significantemente (p

<0,05) maiores que os encontrados no grupo controle e nas demais linhagens. A segunda linhagem mais patogênica foi *I. fumosorosea* ESALQ1297 a qual provocou a morte de 61% dos operários e 35% dos soldados, seguida de *I. javanica* URM4993 que causou a morte de 52% dos operários e 20% dos soldados, enquanto o controle apresentou 16% de mortalidade dos operários e não afetou os soldados, no período analisado ($p < 0,05$).

Os valores de CL_{50} foram determinados para as linhagens mais eficientes de cada espécie, após o 4º dia de tratamento. Estes valores confirmaram a eficiência de *I. farinosa* ESALQ1355 sobre *N. corniger*, pois apresentou CL_{50} de $6,66 \times 10^4$ conídios/mL sobre os operários, sendo este valor inferior aos apresentados por *I. fumosorosea* ESALQ1297 (CL_{50} de $4,60 \times 10^5$ conídios/mL) e *I. javanica* URM4993 (CL_{50} $7,22 \times 10^5$ conídios/mL) (Tabela 4). O valor de CL_{50} sobre os soldados foi menor para *I. farinosa* ESALQ1355 ($6,81 \times 10^4$ conídios/mL) em relação aos apresentados por *I. javanica* URM4993 (CL_{50} $8,25 \times 10^5$ conídios/mL) e *I. fumosorosea* ESALQ1297 (CL_{50} $2,12 \times 10^6$ conídios/mL).

Conforme demonstrado na Tabela 5, as linhagens de *Isaria* não foram eficientes ou apresentaram baixa patogenicidade sobre *D. opuntiae*. Apenas as linhagens *I. farinosa* ESALQ1355 e *I. javanica* (URM4993 e URM4995) causaram taxas de mortalidade entre 7% e 16%, diferindo do controle que apresentou taxa de mortalidade de 5% ($p < 0,05$). As linhagens de *Isaria* avaliadas não causaram a morte de fêmeas adultas da cochonilha-do-carmim.

Foi constatada a diminuição do percentual de germinação dos conídios das linhagens quando testadas com as diferentes concentrações dos inseticidas Clorpirifós e Lambacyhalothrin (Tabela 6). As linhagens apresentaram percentuais de germinação entre 29 e 86%, sendo que o índice de germinação do tratamento controle variou entre 96% a 99% ($p < 0,05$). Os inseticidas Thiamethoxan e Acetamiprid foram compatíveis com todas as linhagens, nas concentrações testadas, apresentando percentuais de germinação de 92% a 98% ($p < 0,05$). Os inseticidas Clorpirifós e Lambacyhalothrin causaram a diminuição significativa do crescimento micelial e esporulação das linhagens, proporcionalmente ao aumento da concentração dos produtos químicos, enquanto os inseticidas

Thiamethoxan e Acetamiprid foram compatíveis com os fungos e não afetaram significativamente o crescimento e a esporulação das linhagens ($p < 0,05$) (Tabela 6).

4. Discussão

Os fungos são os principais patógenos de insetos, pois infectam todos os estágios de desenvolvimento do hospedeiro, penetrando via tegumento, ao contrário dos outros microrganismos que infectam os insetos por meio da ingestão e podem controlar os insetos-praga em ambientes naturais e ecossistemas agrícolas, sendo candidatos relevantes na manutenção do equilíbrio ecológico (Charnley, 1984; Hajek e St Leger, 1994). Dentre os gêneros entomopatogênicos mais importantes no controle de insetos, encontram-se as espécies de *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria*. Alguns fungos desses gêneros apresentam resultados promissores no controle de espécies de cupins e cochonilhas (Milner, 2003; Sun et al., 2003; Wang e Powell, 2003; Meikle et al., 2005; Zimmermann, 2008; Demirci et al., 2011b).

A utilização de entomopatógenos tem sido amplamente investigada como uma alternativa viável no biocontrole de insetos, por apresentar baixa toxicidade para as plantas, animais e o meio ambiente (Velásquez et al., 2007; Demirci et al., 2011a). A seleção desses entomopatógenos é uma das etapas mais importantes para a determinação da virulência, aspectos reprodutivos e produção em meio de cultura artificial, visando sua utilização como bioinseticida (Alves, 1998). As espécies de *Isaria* foram patogênicas a *N. corniger*, causando percentuais de mortalidade variados, sendo este o primeiro relato da patogenicidade dos fungos *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* sobre operários e soldados do cupim. *I. farinosa* ESALQ1355 foi a mais eficaz no controle do inseto, pois promoveu a morte de 95% dos operários e 85% dos soldados, após o quadro dia de tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Meikle et al. (2005), contudo em um tempo duas vezes maior que o observado no nosso estudo. Esses pesquisadores, ao analisarem a patogenicidade de *I. fumosorosea* (1×10^7 conídios/mL) sobre *C. formosanus* verificaram que após dez dias da inoculação, o fungo causou a morte de 100% dos cupins-operários.

O percentual de mortalidade obtido por *I. fumosorosea* ESALQ1297 e *I. javanica* URM4993 após quatro dias do tratamento (61% e 53% dos operários e 35% e 20% dos soldados, respectivamente) corrobora com os valores encontrados por Yanagawa et al. (2008), após seis dias de avaliação, os quais observaram que a ação de *I. fumosorosea* sobre os operários de *C. formosanus* promoveu 40% e 100% de mortalidade quando testado nas concentrações 1×10^7 conídios/ 1×10^8 conídios/mL. Enquanto Wright e Cornelius (2012) verificaram a eficiência de *I. fumosorosea* sobre *C. formosanus*, quando 72,5% dos insetos tratados com a concentração de 1×10^8 conídios/mL, foram mortos após sete dias de inoculação. A ação de *I. javanica* sobre os operários de *N. corniger* mostra a capacidade inseticida do fungo, sendo esta ação também relatada por Lopes et al. (2011) ao constatarem a infecção de *I. javanica* URM4993 e URM495 sobre os operários de *C. gestroi*, nas concentrações de 1×10^4 a 1×10^8 conídios/mL, mas a *I. javanica* URM4993 foi mais eficiente, promovendo a morte acumulada de 100% dos cupins após o seis dias de inoculação e com a maior concentração de conídios.

A atividade termicida de outras espécies de fungos entomopatogênicos sobre *Nasutitermes* tem sido reportada. Milner et al. (1997) investigaram linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin sobre *Nasutitermes exitiosus* (Hill) e observaram percentuais de mortalidade dos operários que variaram de 59% a 86%, sendo estes resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho para *N. corniger*. Por outro lado, Hanel (1982) avaliou 22 linhagens de fungos entomopatogênicos sobre ninfas, operários e soldados de *N. exitiosus* e observou que apenas a espécie *M. anisopliae* foi selecionada, por causar 100% de mortalidade a partir do 6º dia e por crescer e esporular nas temperaturas de 26, 30, 31°C, enquanto as linhagens de *Absidia*, *Conidiobolus* e *Entomophthora* promoveram mortalidade de 7,7 a 74% e não obtiveram ótimo desenvolvimento nas temperaturas testadas.

A formação do micélio de *Isaria* ocorreu a partir do 3º dia em volta das peças bucais e antenas e, em seguida, sobre as membranas intersegmentais e ao redor das patas. O desenvolvimento das linhagens de *Isaria* sobre os *N. corniger* foi semelhante ao descrito por Sun et

al. (2002) e Lopes et al. (2011). As linhagens colonizaram todo o inseto após o 8º dia e apresentaram micélio de aspecto cottonoso e de cor branca, formado por hifas e, possivelmente, a presença de conidióforos e conídios típicos das espécies (Fig. 1). Estas características são semelhantes às descritas por Samson (1974) e Samson et al. (1988) para o desenvolvimento de espécies de *Isaria* sobre insetos-praga. Lopes et al. (2011) relatam que a produção de conídios é uma característica importante na disseminação e permanência dos fungos entomopatogênicos nas populações de cupins, devido ao contato social que permite a transferência dos conídios de cupins infectados para os não infectados, além de aumentar o potencial do inóculo no ambiente do hospedeiro.

A determinação da CL em bioensaios com entomopatógenos é um importante indicador biológico quando aplicado adequadamente, visto que o potencial do fungo consiste na estimativa da CL, sendo este o parâmetro mais eficiente para testes de seletividade do patógeno ao inseto alvo (Alves, 1998). As linhagens *I. farinosa* ESALQ1355, *I. javanica* URM4993 e *I. fumosorosea* ESALQ1297 apresentaram valores da CL₅₀ que variaram de $6,66 \times 10^4$ a $7,22 \times 10^5$ conídios/mL para os operários e de $6,8 \times 10^4$ a $2,12 \times 10^6$ conídios/mL para os soldados, contudo os melhores valores de CL₅₀ foi obtido com *I. farinosa* ESALQ1355. Resultados similares foram observados por Lopes et al. (2011) quando testaram a eficiência das linhagens de *I. javanica* (URM4993 e URM4995) sobre operários de *C. gestroi* em concentrações de 1×10^4 a 1×10^8 conídios/mL, e obtiveram CL₅₀ de $4,86 \times 10^5$ e de $2,19 \times 10^6$ conídios/mL, respectivamente. Todavia, Hanel (1982) reportou a patogenicidade de *M. anisopliae* contra *N. exitiosus* nas concentrações de $1,29 \times 10^3$ e $1,29 \times 10^7$ conídios/mL, verificando CL₅₀ de $5,13 \times 10^5$ e $3,56 \times 10^4$ conídios/mL sobre o cupim, respectivamente. Da mesma forma, Milner et al. (1997) testaram a ação de *M. anisopliae* FI-610 sobre operários de *Coptotermes acinaciformis* (Froggatt) e *N. exitiosus* e constataram que o fungo apresentou valores de CL₅₀ de $5,8 \times 10^5$ e $7,9 \times 10^6$ conídios/mL, para as espécies de cupins, respectivamente, os quais corroboram com os valores da CL₅₀ das espécies de *Isaria* sobre *N. corniger*.

Por outro lado, os dados referentes à patogenicidade de *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosoresea* sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, mostram que estes fungos são ineficazes como biocontroladores da cochonilha-do-carmim. As linhagens de *I. farinosa* (ESALQ1205 e ESALQ1355) e de *I. javanica* (URM4993 e URM4995) foram classificadas como patógenos fracos, pois causaram a morte confirmada de apenas 6% a 16% das ninfas, e nenhuma das linhagens testadas foram capazes de promover mortalidade das fêmeas adultas de *D. opuntiae*. Contudo, espécies de *Isaria* são patogênicas a outras espécies de cochonilhas. *I. farinosa* é testada efetivamente no controle da cochonilha da raiz dos *Citrus*, *Rhizoecus kondonis* Kuwana (Zimmermann, 2008). Demirci et al. (2011a) constataram a patogenicidade de *I. farinosa* sobre os diferentes estágios do ciclo de vida de *P. citri*, cochonilha dos *Citrus*, tendo o fungo causado a morte de 89,39%, dos ovos, 84,07% das ninfas e 78,71% das fêmeas adultas, quando inoculado na concentração 1×10^8 conídios/mL. Mendoza-Lucas et al. (2006) investigaram a eficiência de micoinseticidas comercializados, dentre estes, o Pae-sin à base de *I. fumosoresea*, sobre *P. citri* e verificaram que o bioinseticida comercial promoveu a morte de 99% das fêmeas adultas da cochonilha após o quarto dia da aplicação. Por outro lado, Menezes et al. (2008) relataram a ação patogênica de linhagens de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill contra ninfas de *D. opuntiae*, e verificaram uma mortalidade de 75,70 a 96,80%, após 15 dias inoculação.

A baixa patogenicidade das linhagens de *Isaria* sobre as ninfas e as fêmeas adultas de *D. opuntiae* utilizadas nesse trabalho pode está relacionada com a pequena ou inexistente especificidade desses patógenos sobre a cochonilha-do-carmim. O sucesso dos fungos no controle de insetos depende inicialmente da aderência de seus conídios ao tegumento do hospedeiro, sendo isso possível pelas interações hidrofóbicas entre os conídios e a cutícula do inseto (Bidochka, 1997). As espécies do gênero *Dactylopius* apresentam uma camada protetora que recobre o corpo, constituída por substâncias gordurosas e cerosas que possuem a capacidade de repelir soluções aquosas e de proteger os indivíduos da colônia (Nobel, 2001). É possível que essa barreira

bioquímica possa ter dificultado a fixação e penetração dos conídios de *Isaria* sobre a cutícula de *D. opuntiae*. Geiger e Daane (2001) relataram a dificuldade de produtos químicos em atingir o tegumento das espécies de cochonilhas devido à localização das camadas, que formam a barreira bioquímica. Essa proteção é proporcionada pela presença de camada de cerosa branca que recobre o corpo desses insetos e serve como uma barreira à penetração de produtos utilizados no controle das cochonilhas (Demirci et al., 2011a). Portanto a camada cerosa que reveste o corpo de *D. opuntiae* pode dificultar a germinação dos conídios, uma vez que pode impedir o contato destes com o tegumento do inseto. Entretanto, a associação de entomopatôgenos a diversos adjuvantes, como óleos e extratos vegetais e inseticidas, pode ser uma alternativa viável para potencializar a ação desses patógenos no processo de infecção de seus hospedeiros (Alves, 1998; Dal-Bello, 2001).

Estudos relativos ao efeito de produtos químicos (inseticidas e fungicidas) sobre os fungos entomopatogênicos são importantes, uma vez que se pode inferir quais os produtos e concentrações são mais compatíveis com os patógenos, visando à utilização desses em conjunto no controle de insetos-praga, o que possibilita a potencialização desses fungos. Entretanto, a utilização de inseticidas incompatíveis pode inibir o desenvolvimento dos patógenos, causando prejuízos no manejo integrado de pragas (Amjad et al., 2012).

Os inseticidas Clorpirifós e Lambacyhalothrin causaram diminuição significativa na germinação dos conídios das espécies de *Isaria* avaliadas. Resultado similar foi observado por Asi et al. (2011) quando avaliaram a influência de 13 inseticidas sobre *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* e verificaram que os produtos inibiram significativamente a germinação dos fungos, nas concentrações recomendadas para o uso em campo, sendo Clorpirifós o inseticida mais tóxico, seguido por Methomyl, Thiodicarb e Chlorfenapyr. Estudo anterior mostrou a ação de nove fungicidas sobre fungos entomopatogênicos, incluindo, *I. farinosa*, sendo que a germinação deste fungo foi completamente inibida pelo fungicida Mancozeb (Majchrowicz e Poprawski, 1993). Outros estudos demonstraram completa inibição da germinação dos conídios de *I. fumosorosea* quando inoculados na presença do fungicida Captan (Er e Gökçe, 2004) e de *Lecanicillium lecanii*

(Zimmermann) Gams & Zare, na presença do inseticida Endosulfan (Gurulingappa et al., 2011). Demirci et al. (2011b) relataram que o fungicida Tebuconazole inibiu a germinação dos conídios de *I. farinosa* na concentração de 1 µg/mL, enquanto os fungicidas Captan, Chlorothalonil, Mancozeb e Propineb inibiram a germinação do fungo, quando testados na concentração de 5 µg/mL. Amjad et al. (2012) constataram que a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* e *Lecanicillium muscarium* (Zimmerman) Viegas variou significativamente de acordo com a concentração e natureza dos nove pesticidas testados, sendo Azocyclotin o mais tóxico na germinação dos conídios.

Os inseticidas Thiamethoxan e Acetamiprid foram compatíveis a *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* nas concentrações mínima, média e máxima, pois não proveram a diminuição da germinação dos conídios das linhagens. Estes resultados corroboram com os relatados por Gurulingappa et al. (2011) quando testaram nove inseticidas sobre *L. lecanii* e verificaram que Thiamethoxan e Acetamiprid não afetaram a germinação dos conídios. Amjad et al (2012) também constataram que Acetamiprid inibiu a germinação de conídios de *I. fumosorosea* apenas na maior concentração testada, sendo compatível com as demais concentrações. Do mesmo modo, Demirci et al. (2011b) relataram que o fungicida Oxidloreto de Cobre e Enxofre não inibiu a germinação dos conídios de *I. farinosa*, mesmo nas concentrações mais elevadas (1000-2000 µg/mL).

Os inseticidas Clorpirifós e Lambda-cyhalothrin promoveram efeito negativo sobre as espécies de *Isaria* testadas, inibindo o crescimento micelial e a esporulação conídios dos fungos, principalmente com a concentração máxima (C_{medx2}). Estes resultados são similares aos reportados por Vänninen e Hokkanen (1988) para *I. farinosa* e *I. fumosorosea*, cujos crescimento e esporulação foram inibidos em presença dos fungicidas Chlorophenoxy e Propiconazole. Outro resultado demonstrou que o produto químico Captan inibiu completamente o crescimento micelial dos isolados de *I. fumosorosea* (Er e Gökçe, 2004). Asi et. al (2011) também encontraram resultados semelhantes com Clorpirifós sobre o crescimento micelial de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*. Da mesma forma, Rachappa et al. (2007) relataram que Clorpirifós promoveu efeitos extremamente nocivos nos estágios de desenvolvimento de *Metarhizium*. Amjad et al. (2012) relataram que o

pesticida Azocyclotin foi altamente tóxico sobre *I. fumosorosea* e *L. lecanii*, inibindo significativamente o crescimento micelial dos fungos. O crescimento micelial de *I. farinosa* foi inibido pelo fungicida Mancozeb adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 2,5 µg/mL e 5 µg/mL (Demici et al., 2011b). No presente estudo, os inseticidas Thiamethoxan e Acetamiprid não causaram efeito negativo sobre as linhagens, uma vez que não houve diminuição significativa nos percentuais de crescimento micelial e esporulação conídios, podendo ser considerados como sinérgicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Gurulingappa et al. (2011) quando observaram que os inseticidas Thiamethoxan, Acetamiprid e Imidacloprid não inibiram significativamente o crescimento micelial de *L. lecanii* nas mesmas concentrações testadas neste estudo. Os fungicidas Azoxistrobina, Clorotalonil, Oxicloreto de Cobre e Enxofre, Fosetil-al e Propineb foram inofensivos a *I. farinosa* quando testados na concentração de 5 µg/ml e; o Oxicloreto de Cobre e Enxofre não inibiu o crescimento do fungo mesmo na maiores concentrações (1000 µg/ml e 2500 µg/ml) (Demici et al., 2011b). Amjad et al. (2012) também verificaram o que o Acetamiprid foi o mais compatível e menos tóxico pesticida sobre *I. fumosorosea*, enquanto os demais pesticidas inibiram o crescimento micelial do fungo. Portanto, os inseticidas Thiamethoxan e Acetamiprid não afetaram o crescimento, a germinação e a esporulação dos conídios das espécies de *Isaria*, sendo estes indicados para possíveis estudos de controle integrado de *D. opuntiae*, em conjunto, principalmente, com *I. farinosa* ESALQ1355 e *I. javanica* URM4995, visando o sinergismo da associação, a qual pode aumentar a ação dos fungos entomopatogênicos no controle da cochonilha-do-carmim. No controle integrado, fungos entomopatogênicos e inseticidas seletivos pode agir sinérgicamente aumentando a eficiência do controle, sendo que as baixas concentrações do produtos químicos utilizados podem preservar os inimigos naturais das pragas e diminuir a poluição ambiental e o aparecimento de insetos resistentes (Alves, 1998; Ambethgar, 2009).

5. Conclusão

Os insetos *N. corniger* e *D. opuntiae* são pragas importantes nas áreas urbanas e agrícolas,

respectivamente, de vários países, incluindo o Nordeste brasileiro, sendo necessária a busca por métodos mais eficazes de controle desses insetos e que vise o equilíbrio com o meio ambiente, pela diminuição do uso de inseticidas químicos. Finalmente, os resultados deste trabalho indicam que as linhagens de *Isaria* foram patogênicas sobre os operários e soldados de *N. corniger*, sendo a mais eficiente *I. farinosa* ESALQ1355, com potencial termicida para ser utilizado no controle de *N. corniger* em áreas urbanas. Além disso, os inseticidas Thiamethoxan e Acetamiprid foram compatíveis com as espécies de *Isaria*, sendo a associação fungo e inseticida uma alternativa viável que pode ser testada sobre *D. opuntiae*, visando potencializar ação de *Isaria* no controle do inseto.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da Bolsa de Doutorado, ao primeiro autor. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo apoio financeiro à pesquisa.

7. Referências

Alves, S.B., 1998. Controle microbiano dos insetos, segunda ed. FEALQ, Piracicaba, Brasil.

Ambethar, V., 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. J. Biopestic. 2, 177-193.

Amjad, M., Bashir, M.H., Afzal, M., Sabri, M.A., Javed, N., 2012. Effects of commercial pesticides against cotton whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) and mites (*Tetranychus urticae* Koch) on growth and conidial germination of two species of entomopathogenic fungi. Pak. J. Life Soc. Sci. 10, 22-27.

Asi, M.R., Bashir, M.H., Afzal, M., Ashfaq, M., Sahi, S., 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. Pak. J. Bot. 4, 4207-4214.

Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L., 2002. Supplementing spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) based diets with urea-treated straw or oldman saltbush (*Atriplex nummularia*). Effects on intake, digestion and sheep growth. J. Agric. Sci. 138, 85-92.

Bidochka, M.J., St Leger R.J., 1997. Mechanisms of deuteromycetes fungal infections in grasshoppers and locusts, an overview. Mem. Ent. Soc. Can. 171, 213-224.

Brutsch, M.O., Zimmermann, H.G. 1993. The prickly pear (*Opuntia ficus-indica* [Cactaceae]) in South Africa; utilization of the naturalized weed, and of the cultivated plants. Econ. Bot. 47, 154-162.

Charnley, A.K., 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi a speculative review, in: Anderson, J.M., Raymor, A.D.M., Walton, D.W.H. (Eds.), Invertebrate Microbial Interactions. Cambridge University Press., New York, pp. 229-270.

Chavez-Moreno, C.K.A., Tecante, A., Casas, E.A., 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. Biodivers. Conserv. 18, 3337-3355.

Constantino, R., 2002. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. J. Appl. Entomol. 126, 355-365.

Dal-Bello, G., Padin, S., López-Lastra, C., Fabrizio, M., 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. J. Stored. Prod. Res. 37, 77-84.

Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M.B., Ulgentur, S., 2011a. Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. J. Pest. Sci. 84, 337-342.

Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M.B., Ulgentur, S., 2011b. Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. Phytoparasitica. 39, 353-360.

Dubois, T., Lund, J., Bauer, L.S., Hajek, A.E., 2008. Virulence of entomopathogenic hypocreale an fungi infecting *Anoplophora glabripennis*. BioControl. 53, 517-528.

Er, M.K., Gökçe, A., 2004. Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. Biol. Control. 31, 398-404.

Geiger, C.A., Daane, K.M., 2001. Seasonal movement and sampling of the grape mealybug, *Planococcus maritimus* (Ehrhorn) (Homoptera: Pseudococcidae) in San Joaquin Valley vineyards. J. Econ. Entomol. 94, 291-301.

Griffith, M.P., 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): New molecular evidence. Am. J. Bot. 91, 1915-1921.

Gurulingappa, P., Gee, M.P., Sword, G.A., 2011. In vitro and in planta compatibility of insecticides

and the endophytic entomopathogen, *Lecanicillium lecanii*. Mycopathologia, 172, 161-168.

Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu. Rev. Entomol. 39, 293-322.

Hanel. H.A., 1982. Selection of a fungus species, suitable for the biological of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). Z. Angew. Entomol. 94, 237-245.

Hoffmann, J.H., Moran, V.C., Zimmermann, H.G., 1999. Integrated management of *Opuntia stricta* (Haworth) Haworth (Cactaceae) in South Africa: an enhanced role for two, renowned, insect agents. Afr. Entomol. Mem. 1, 15-20.

Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). Mokuzai. Gakkaishi. 36, 78-84.

Le Houérou, H.N., 1996. The role of *cacti* (*Opuntia spp.*) in erosion controle e land reclamation, rehabilitation and agricultural development in Mediterranean Basin. J. Arid Environ. 33, 135-159.

Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Chávez-Flores, O., Ángel-Sahagún, C.A., Skoda, S.R., Reyes-Martínez, G., Barba-Reynoso, M., Rebolledo-Domínguez, O., Ruíz-Aguilar, G.M.L., Foster J.E., 2012. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. Int. J. Trop. Insect. Sci. 32, 39-44.

Lopes, R.S., Svedese, V.M., Portela, A.P.A.S., Albuquerque, A.C., Luna-Alves, Lima. E.A., 2011. Virulence and biological aspects of *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones in *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). Arq. Inst. Biol. 78, 565-572.

Majchrowicz, I., Poprawski, T.J. 1993. Effects in vitro of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. Biocontrol. Sci. Techn. 3, 321-336.

Meikle, W.G., Mercadier, G., Rosengaus, R.B., Kirk, A.A., Derouané, F., Quimby, P.C., 2005. Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Deuteromycota: Hyphomycetes) obtained from formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Appl. Entomol. 126, 315-322.

Mendoza-Lucas, M., Rosas, R.A., Rosas, F.H., Hernández, H.G., Diaz, C.N., 2006. Susceptibilidad del piojo harinoso, *Planococcus citri* (Risso, 1913) (Hemiptera: Pseudococcidae) a productos micoinsecticidas. Entomotropica. 21, 171-179.

Menezes, M.E.L., Brito, ES., Malheiro MG., Lopes, A.C.R., Santos, P.S., Gava, C.A.T.S., 2008. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Dactylopius opuntiae* Cockerel (Hemiptera: Dactylopiidae) no semiárido nordestino. Doc. Embrapa Inform. Agropecu. 2195, 83-89.

Milner, R.J., 2003. Application of biological control agents in mound building termites (Isoptera: Termitidae) – experiences with *Metarhizium anisopliae* in Australia. Sociobiology. 41, 419-428.

Milner, R.J., Staples, J.A., Lutton, G.G., 1997. The effect of humidity on germination and infection

of termites by Hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 69, 64-69.

Milano, S.E., Fontes, L.R., 2002. Termite pests and their control in urban Brazil. Sociobiology. 40, 163-177.

Nobel, P.S., 2001. Ecophysiology of *Opuntia ficus-indica*, in: Mondragón-Jacobo, C., Pérez-González, S., (Eds.), Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) – Plant production and protection paper, Rome, pp. 13-20.

Osborne, L.S., 1990. Biological control of whiteflies and other pests with a fungal pathogen. United States Patent. 4942.030.

Rachappa, V., Lingappa, S., Patil, R.K., 2007. Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Karnataka J. Agri. Sci. 20, 410-413.

Samson, R.A., 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Stud. Mycol. 6, 119.

Samson, R.A., Evans, H.C., Paul-Latge, J., 1988. Taxonomy of entomopathogenic fungi, in: Samson, R.A. (Ed.), Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin, pp. 5-16.

Santos, D.C., Farias, I., Lira, M.A., Santos, M.V.F., Arruda, G.P., Coelho, R.S., Dias, F.M., Melo, J.N., 2006. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco, 30 ed. Instituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Brasil.

Sas Institute, 1999-2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, sixth ed. SAS Institute, Cary, NC.

Scheffrahn, R.H., Cabrera, B.J., Kern Jr, W.H., Su, N.Y., 2002. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. Fla Entomol Soc. 85, 273-275.

Scheffrahn, R.H., Jones, S.C., Krecek, J., Chase, J.A., Mangold, J.R., Su, N.Y., 2003. Taxonomy, distribution, and notes on the termites (Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, and Termitidae) of Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. Ann. Entomol. Soc. Am. 96, 181-201.

Scheffrahn, R.H., Krecek, J., Szalanski, A.L., Austin, J.W., 2005. Synonymy of the neotropical arboreal termites, *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. Ann. Entomol. Soc. Am. 98, 273-281.

Scheffrahn, R.H., Krecek, J., Chase, J.A., Maharajh, B., Mangold, J.R., 2006. Taxonomy, biogeography, and notes on the termites (Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae) of the Bahamas and Turks and Caicos Islands. Ann. Entomol. Soc. Am. 99, 463-486.

Scorsetti, A.C., Humber, R.A., De Gregório, C., Lastra, C.C.L., 2008. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* pests of horticultural crops in Argentina. BioControl. 53, 787-796.

Sun, J., Fuxa, J.R., Henderson, G., 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and *in vitro*. J. Invertebr. Pathol. 81, 78-85.

Sun, J., Fuxa, J.R., Henderson, G., 2003. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. J. Invertebr. Pathol. 84, 38-46.

Torales, G.J., 2002. Termites as structural pests in Argentina. *Sociobiology*. 40, 191-206.

Vänninen, I., Hokkanen, H., 1988. Effect of pesticides on four species of entomopathogenic fungi *in vitro*. *Ann. Agric. Fenn.* 27, 345-353.

Vasconcellos, A., Bandeira, A.G., 2006. Populational and reproductive status of a polycalic colony of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) in the urban area of João Pessoa, NE Brazil. *Sociobiology*. 47, 165-174.

Velásquez, V.B., Cárcamo, M.P., Meriño, C.M., Iglesias, A.F., Durán, J.G., 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genet. Mol. Biol.* 30, 89-99.

Vigueiras, A.L., Tovar, J.C., Pelayo-Ortiz, C., 2009. Use of botanicals extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on Cactus Pear. *Acta Hort.* 811, 299-234.

Volchansky, C.R., Hoffann, J.H., Zimmerman, H.G., 1999. Host-plant affinities of two biotypes of *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae) enhanced prospects for biological control of *Opuntia stricta* (Cactaceae) in South Africa. *J. Appl. Ecol.* 36, 85-90.

Zimmermann, G., 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol. Sci. Techn.* 18, 865-901.

Wang, C., Powell J.E., 2003. Isolation and evaluation of *Beauveria bassiana* of control of

Coptotermes formosanus and *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology. 41, 248-255.

Wright, M.S., Connick, W.J., Jackson, M.A., 2003. Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.

Wright, M.S., Cornelius, M.L., 2012. Mortality and repellent effects of microbial pathogens on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). BMC. Microbiol. 12, 291-298.

Wright, M., Alan, L., 2013. Combined effect of microbial and chemical control agents on subterranean termites J. Microbiol. 51, 578-583

Yanagawa, A., Yokohari, F., Shimizu, S., 2008. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. J. Invertebr. Pathol. 97, 165-170.

8. Apêndice

Tabela 1. Inseticidas utilizados nos experimentos e registrados para o controle de cochonilhas da ordem Hemiptera.

Nome do Produto	Tipo de Formulação	Tipo Químico	Constituinte Ativo	Concentração (L)		
				Mínima	Média	Máxima
Lorsban 480 BR	Concentrado	Organofosforado	Clorpirifós	0,75mL/L	1,5mL/L	3,0mL/L
	Emulsionável					
Mospilan	Pó soluvel	Neonicotinóide	Acetamiprid	0,125g/L	0,25g/L	0,5g/L
Actara 250 WG	Granulado dispersível	Neonicotinóide	Thiamethoxan	0,1g/L	0,2g/L	0,4g/L
Karatê ZEON 250 CS	Suspensão de encapsulado	Piretróide	Lambacyhalothrin	0,5mL/L	1,0mL/L	2,0mL/L

Tabela 2. Linhagens de *Isaria* utilizadas nos experimentos e percentual de germinação.

Linhagens	Origem	Hospedeiro	Germinação (%)
<i>Isaria farinosa</i> URM5016	Micoteca/URM	Escamas epidérmicas e pêlo de Lhamas	92
<i>Isaria farinosa</i> URM5060	Micoteca/URM	Raízes de cana-de-açúcar	90
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1205	Micoteca/UFRPE	<i>Bemisia tabaci</i>	90
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355	Micoteca/UFRPE	<i>Brassolis sopharea</i>	91
<i>Isaria javanica</i> URM4993	Micoteca/URM	<i>Lonomia obliqua</i>	98
<i>Isaria javanica</i> URM4995	Micoteca/URM	<i>Lonomia obliqua</i>	96
<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1296	Micoteca/UFRPE	<i>Lagria villosa</i>	96
<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297	Micoteca/UFRPE	<i>Bemisia tabaci</i>	91

Tabela 3. Mortalidade confirmada de *Nasutitermes corniger* por linhagens de *Isaria* após quatro dias de infecção.

Linhagens	Mortalidade (%)	
	Operários	Soldados
<i>Isaria farinosa</i> URM5016	20 c	10b
<i>Isaria javanica</i> URM5060	30 bc	10 b
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1205	53 bc	95 a
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355	95 a	85 a
<i>Isaria javanica</i> URM4993	53 bc	20 b
<i>Isaria javanica</i> URM4995	53 bc	15 b
<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1296	21 bc	10 b
<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297	61ab	35 b
Controle	16 c	0 b
C.V. (%)	21,13	18,48

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey

Tabela 4. Concentração Letal (CL₅₀) das linhagens de *Isaria* sobre os operários e soldados de *Nasutitermes corniger*

Linhagens	Operários			Soldados		
	CL ₅₀ (IC) ¹ (conídios/L)	Equação de regressão	(χ^2) ²	CL ₅₀ (IC) (conídios/mL)	Equação de regressão	(χ^2)
<i>I. farinosa</i> ESALQ1355	6,66x10 ⁴ (12,47-3,10)	Y=1.3492+0,75683*logX	20,07	6,81x10 ⁴ (41,62-0,12)	Y=2.82093+0,45086*logX	9,12
<i>I. javanica</i> URM4993	7,22x10 ⁵ (20,25-2,43)	Y=2.74613+0,38469*logX	27,38	8,24x10 ⁵ (25,96-2,57)	Y=0,20116+0,87913*logX	15,4
<i>I. fumosorosea</i> ESALQ1297	4,60x10 ⁵ (13,10-1,38)	Y=2.90016+037078*logX	80,39	2,12x10 ⁶ (13,84-0,43)	Y=1.51840+0,55032*logX	18,27

¹Intervalo de confiança significativo a 95%.

² Teste de qui-quadrado calculado pelo Probit

Tabela 5. Percentual de mortalidade de ninfas de *Dactylopius opuntiae* tratadas com as linhagens de *Isaria*

Linhagens	Mortalidade (%)
<i>Isaria farinosa</i> URM5016	0 c
<i>Isaria farinosa</i> URM5060	0 c
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1205	6 bc
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355	16a
<i>Isaria javanica</i> URM4995	14 a
<i>Isaria javanica</i> URM4993	7 b
<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1296	0 c
<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297	0 c
Controle	5 bc
C.V. (%)	17,28

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre elas a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Efeito dos inseticidas sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10^7 conídios/mL) das espécies de *Isaria*.

Aspectos Biológicos das Linhagens									
Inseticida/concentração	<i>Isaria farinosa</i>			<i>Isaria javanica</i>			<i>Isaria fumosorosea</i>		
	ESALQ1355			UM4995			ESALQ1297		
	G ¹	C ²	E ³	G	C	E	G	C	E
Clorpirifós									
Controle	99a	4,0a	6,3a	99a	3,0a	2,0a	99a	3,4a	3,0a
Mínima	55b	1,4b	1,9b	84 b	1,7b	0,9ab	87b	1,2bc	1,2b
Média	29c	0,7 c	0,7c	83b	1,2b	0,6b	87b	0,0c	0,0b
Máxima	0,0d	0,0d	0,0c	63c	0,5c	0,4b	51b	0,0c	0,0b
Acetamiprid									
Controle	99a	3,6a	6,3a	99 a	3,2a	1,6a	99a	3,4a	3,0a
Mínima	98a	3,5a	5,9a	94a	3,2a	1,8a	92a	3,2ab	2,9a
Média	96a	3,5 a	4,3b	92a	2,8a	1,5a	79b	3,0ab	2,7a
Máxima	95a	2,8a	3,6b	91a	2,7a	0,9b	75b	2,7b	2,6a
Thiamethoxan									
Controle	96a	3,3a	7,8a	98a	3,6a	2,8a	99a	3,7a	3,0a
Mínima	94a	3,3a	7,3a	97a	3,3a	2,7a	98a	3,4ab	2,3ab
Média	93a	3,2a	6,2a	96a	3,2a	2,5a	98 a	3,3ab	2,2ab
Máxima	92 a	3,2a	5,4a	96a	3,0a	1,8ab	98a	3,0b	1,5b
Lambacyhalothrin									
Controle	99a	3,3a	7,3a	99a	3,5a	2,8a	99a	3,4a	1,3a
Mínima	86 b	2,0 b	4,3b	87b	3,0ab	2,3ab	86b	3,4 a	0,8b
Média	86b	1,9 b	3,1bc	86b	2,8b	1,8ab	85b	3,3a	0,8b
Máxima	80 b	2,3b	2,0 c	80b	2,7b	1,5b	75b	2,2b	0,0c

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

¹ Germinação, ² Crescimento, ³ Esporulação.



Fig. 1. Operário de *Nasutitermes corniger* colonizado por *Isaria farinosa* ESALQ1355.

5.2 CAPÍTULO III: ARTIGO 2

Efeito dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e *Agave sisalana* no controle de *Dactylopius opuntiae* praga da palma forrageira

Artigo a ser submetido à revista Scientia Horticulturae

Fator de Impacto: 1.504

Efeito dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e *Agave sisalana* no controle de *Dactylopius opuntiae* praga da palma forrageira

Rosineide da Silva Lopes¹, Luciana Gonçalves de Oliveira², Geiziquele de Lima², Antonio Félix da Costa², Maria Tereza dos Santos Correia¹, Elza Áurea de Luna Alves Lima^{3*}, Vera Lúcia de Menezes Lima^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil.

² Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Av. General San Martins, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Micologia – CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Brasil.

* Autor para correspondência: Fax: +55 81 2126-8540

E-mail: lima.vera.ufpe@gmail.com e elza.aurea@gmail.com

Resumo

A cochonilha do carmim, *Dactylopius opuntiae*, ameaça as culturas de *Opuntia ficus-indica*, causando perdas na produção da palma, a qual é usada como forragem para os animais do semiárido brasileiro. O controle de *D. opuntiae* por inseticidas pode ocasionar danos ao homem e ao ambiente. O trabalho teve por objetivo analisar o potencial inseticida dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e *Agave sisalana*; dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin e da associação dos extratos e dos inseticidas no controle das ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*. Cladódios infestados com o inseto foram pulverizados com os extratos aquoso e metanólico de folhas (EAFLf e EMFLf) e de vagens (EAVLf e EMVLf) de *L. ferrea* var. *ferrea* e os extratos aquoso (EAAs) e hidroetílico (EHEAs) de *A. sisalana*, nas concentrações de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL, e com os inseticidas, nas concentrações mínima, média e máxima, determinadas a partir da concentração recomendada pelo fabricante. Os extratos apresentaram efeito positivo sobre *D. opuntiae*, sendo que os de folhas de *L. ferrea* var. *ferrea* e o EHEAs foram mais eficientes no controle das fêmeas adultas, enquanto EMVLf e EMFLf apresentaram maior potencial inseticida sobre as ninfas. O inseticida Clorpirifós foi o mais eficiente sobre ninfas e fêmeas adultas da cochonilha. A associação dos extratos com o inseticida Clorpirifós foi a mais eficiente no controle da cochonilha. Os resultados demonstram o potencial de extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e de *A. sisalana* no controle de *D. opuntiae*, sendo estes viáveis a serem usados isoladamente ou associados aos inseticidas testados no controle dessa praga, nas plantações de palma.

Palavras-chave: controle biológico, extratos vegetais, agave, pau-ferro, cochonilha-do-carmim, inseticida.

1. Introdução

As cactáceas do gênero *Opuntia* são utilizadas para diversas finalidades como alimentação humana (frutos e cladódios são consumidos frescos ou secos) e forragem para animais produtores de leite. Também são usadas como substrato para criação das cochonilhas do gênero *Dactylopius*, produtoras do ácido carmínico (Medina et al., 2007). Dentre essas, encontra-se a cactácea de origem mexicana, *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., importante para o desenvolvimento econômico das áreas árida e semiárida, em especial, na América do Sul, em países como o Brasil e o México, onde a palma é amplamente utilizada como fonte alimentar, principalmente para os animais das bacias leiteiras, devido ao teor de água (± 90) e nutrientes como carboidratos solúveis, cálcio e vitaminas (Hoffmann et al., 1999; Ben Salem et al., 2002; Ennouri et al., 2006; Santos et al., 2006; Vilela et al., 2010). A importância nutricional do fruto da palma se dar pelo teor do ácido ascórbico, das fibras e dos aminoácidos livres (Stintzing et al., 2001), e as sementes acumulam proteínas antes do amadurecimento do fruto (Walker et al., 2011), apresentando a palma potencial na medicina popular devido a sua ação anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e analgésica (Fernandez et al., 1992).

Diversas espécies de *Opuntia* são parasitadas pela cochonilha *Dactylopius opuntiae* (Cockerell), incluindo *O. ficus-indica* e *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. (Chaves-Moreno et al., 2009). Em vários países como Peru, Ilhas Canárias e México, a cochonilha é utilizada na produção do corante carmim, derivado do ácido carmínico, usado na indústria alimentícia e; no controle de cactáceas invasoras (Hoffmann et al., 1999; Volchansky et al., 1999). Esse inseto ameaça as cultivares de palma na África do Sul, Brasil e México, causando perdas na produção de forragem e dos frutos, ocasionando enormes prejuízos econômicos aos agricultores e pecuaristas (Brutsch e Zimmermann, 1993; Santos et al., 2006; Viguera et al., 2009; Silva et al., 2010). O uso de inseticidas químicos no controle de pragas apresenta resultados imediatos, contudo o seu emprego

sem orientação agronômica pode ocasionar prejuízos irreversíveis ao homem e ao meio ambiente, devido ao alto custo e à contaminação ambiental, além de, no caso da cochonilha e da palma, não existir produtos químicos registrados no Brasil. Todavia, o uso de inseticidas químicos para o controle de grandes focos de infestação de *D. opuntiae* é recomendado (Santos et al., 2006) e utilização de cultivares de palmas resistentes a cochonilha para manter o inseto-praga a níveis que não danifiquem e aumentem a produtividade das plantações (Santos et al. 2006; Falcão et al., 2013). Uma alternativa a ser testada para o controle de *D. opuntiae* é o uso de agentes entomopatogênicos, com os extratos vegetais.

Espécies vegetais são resistentes a ataques de insetos, sendo que essa resistência pode ser mediada pela produção e ação de metabólitos primários e secundários como proteínas (lectinas), alcalóides, taninos, terpenóides, entre outros (Mello e Silva-Filho, 2002, Souza et al., 2011). Essas substâncias têm ação inseticida mais benéfica quando comparadas aos produtos químicos, pois são renováveis, facilmente degradáveis e não contaminam o meio ambiente (Oliveira et al., 2007). Nesse sentido, Viguera et al. (2009) testaram extratos de diversas espécies vegetais sobre ninfas e adultos de *D. opuntiae*, e verificaram a mortalidade do inseto entre 82 e 98%. Espécies vegetais encontradas no Nordeste do Brasil podem ser usadas no controle de insetos por demonstrar ação inseticida (Sá et al., 2009).

Libidibia ferrea (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz (= *Caesalpinia ferrea*) é uma árvore leguminosa distribuída na região semiárida do Norte e Nordeste do Brasil, conhecida como pau-ferro ou jucá, sendo usada na indústria de fármacos, na construção civil e na medicina popular (Lorenzi, 2002, Queiroz, 2010). Os componentes químicos presentes nas folhas, frutos e raízes de *L. ferrea* apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, anticancerígenas e antibacterianas (Carvalho et al., 1996; Nakamura et al., 2002, Freitas et al., 2012) e podem ter ação inseticida. Por sua vez, o sisal, *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Agavaceae) é uma planta herbácea, originária da América Central e México, sendo encontrada em muitos países tropicais, como a Tanzânia e o Brasil (Chand et al., 1998). O Brasil é o principal produtor de sisal, sendo as fibras obtidas de suas

folhas usadas para a confecção de cordas, fios, tapetes e na indústria em geral (Branco et al., 2010; Santos et al., 2013). Os resíduos líquidos e metabólitos secundários do sisal (alcalóides, saponinas e taninos) têm ação inseticida, sendo essa ação comprovada pelo uso do suco bruto e os extratos de *A. sisalana* em larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* (L.) e *Culex quinquefasciatus* Say (Pizarro et al., 1999) e no controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch.) (Barreto et al., 2010).

A necessidade de se minimizar os prejuízos econômicos causados pela cochonilha-do-carmim, em especial, no Nordeste brasileiro, tem incentivado os pesquisadores a buscarem novas alternativas para o controle desse inseto. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana*, e dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin, bem como a associação de extratos e inseticidas no controle *D. opuntiae*.

2. Material e Métodos

2.1 *Dactylopius opuntiae*

A cochonilha *D. opuntiae* foi coletada em plantações de palma, no Sertão do Moxotó e do Pajeú, no estado de Pernambuco/Brasil, e as palmas foram acondicionadas em potes plásticos. A criação do inseto foi realizada em sala climatizada a 26 ± 1 °C, localizada no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA)/Brasil, e os cladódios da palma sadios foram infestados com ninfas de primeiro estágio da cochonilha e colocados horizontalmente sobre estantes de madeira. Foram realizados testes experimentais com ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, após 12 e 40 dias de infestação, respectivamente. As palmas com as fêmeas adultas foram pulverizadas com uma solução de detergente neutro a 2% para retirar o excesso de cera do corpo do inseto, visando o melhor contato das suspensões dos fungos testados.

2.2 Obtenção dos Extratos vegetais

Folhas e vagens de *L. ferrea* var. *ferrea* e folhas de *A. sisalana* foram coletadas de espécimes localizadas na cidade do Recife, Pernambuco/Brasil. As espécies foram identificadas no Departamento de Botânica, do Instituto Agrônomo de Pernambuco, sendo o material botânico depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima. Após a coleta, o material foi lavado em água destilada para remoção de impurezas, seco à temperatura ambiente e triturado. Para a obtenção do extrato aquoso das folhas e vagens de *L. ferrea* var. *ferrea* (EAFLf e EAVLf), 20 g das farinhas foram misturados a 80 mL da solução de NaCl 0,15 M para uma concentração final de 20% (p/v). A suspensão foi agitada 16 horas, a 4 °C, depois foi filtrada e o extrato foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Para o extrato metanólico de *L. ferrea* var. *ferrea* (EMFLf e EMVLf), 20 g das farinhas foram submetidos à infusão metanólica (80 mL) com agitação por 24 horas, sendo a suspensão filtrada e o extrato submetido a um rotoevaporador. Para *A. sisalana* foram feitos os extratos aquoso (EAAs) e extrato hidroetílico (EHEAs), sendo o extrato aquoso obtido conforme o protocolo utilizado para o extrato de *L. ferrea* var. *ferrea*. Para o extrato hidroetílico, 20 g do vegetal foram submetidos à infusão hidroetílica a 70% (80 mL) durante duas horas, sendo depois filtrado. Em seguida, o álcool foi evaporado por 16 horas à temperatura de 45° C. Os extratos a 200 mg/mL foram diluídos (solução Tween 80 a 0,1%) até a obtenção das concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 10 mg/mL.

2.3 Inseticidas químicos utilizados nos experimentos

Os inseticidas químicos Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambdacyhalothrin foram selecionados por serem utilizados no controle de insetos da ordem Hemiptera como cochonilhas, e serem disponíveis comercialmente. Os inseticidas foram utilizados em três concentrações preestabelecidas de acordo com as recomendações do fabricante, sendo a concentração média

(CMed) aquela recomendada para o uso em campo, a concentração mínima (CMed/2) e a concentração máxima (CMedx2), conforme a Tabela 1.

2.4 Efeito dos inseticidas químicos e dos extratos vegetais sobre *Dactylopius opuntiae*

Palmas infestadas com ninfas e fêmeas adultas foram pulverizadas separadamente com 10 mL das concentrações dos extratos e dos inseticidas e da solução Tween 80 a 0,1% (tratamento controle), com um pulverizador manual De Vilbiss nº 15. Após a pulverização, as palmas foram colocadas em potes plásticos retangulares, com dimensão aproximada de 30 cm x 15 cm x 8 cm, e mantidas em sala climatizada à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. As avaliações foram feitas após 10 dias da aplicação dos tratamentos, utilizando como área de avaliação um quadrado de 64 cm^2 (8 cm x 8 cm) em cada palma, com aproximadamente 50 indivíduos, sendo realizada três avaliações por tratamento. As avaliações foram feitas após 10 dias da aplicação dos tratamentos, em três quadrados de 64 cm^2 . A análise da mortalidade foi realizada em estereomicroscópio, sendo os insetos com modificação na coloração, corpo desidratado, flácido e sem movimentos considerados mortos. Em seguida, foram determinados os percentuais de mortalidade e a Concentração Letal (CL₅₀).

2.5 Ação da associação dos extratos vegetais e dos inseticidas sobre *Dactylopius opuntiae*

Para este experimento foram feitas suspensões com a associação da CL₅₀ de cada extrato com a CL₅₀ dos inseticidas. Em seguida, palmas infestadas com as ninfas e as fêmeas adultas foram pulverizadas, separadamente, com 10 mL das suspensões associadas e para o tratamento controle, as palmas foram pulverizadas apenas com os extratos, os inseticidas e a solução Tween a 0,1% (controle). As palmas foram transferidas para potes plásticos retangulares e mantidas em sala climatizada a 26°C por 10 dias. As avaliações foram após 10 dias da aplicação dos tratamentos feitas, utilizando como área de avaliação um quadrado de 64 cm^2 (8 cm. x 8 cm.) em cada palma, com 50 indivíduos, sendo realizada três avaliações por tratamento e o percentual de mortalidade das ninfas e fêmeas adultas foi determinado.

2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme análise de variância (ANOVA) utilizando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute, 1999-2001). As médias das concentrações letais (CL₅₀) foram determinadas por meio do Proc Probit (SAS Institute 1999-2001).

3. Resultados

A Tabela 2 mostra a ação dos quatro inseticidas no controle das ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*. Todos os inseticidas causaram a mortalidade das ninfas e diferiram do tratamento controle que apresentou mortalidade de 8% ($p < 0,05$). O inseticida Clorpirifós foi o mais eficiente, causando a morte de 93% das ninfas com a concentração mínima (0,75 mL/L), não diferindo das demais concentrações (1,5 e 3,0 mL/L). Os demais inseticidas causaram mortalidade entre 53% a 80% e estas médias diferiram entre as concentrações testadas e também entre tratamento controle, sendo o efeito do inseticida diretamente proporcional ao aumento da concentração ($p < 0,05$). No bioensaio com as fêmeas adultas, os inseticidas mais eficientes foram Clorpirifós (81% a 97%) e Lambacyhalothrin (62% a 93%), sendo constatada diferença entre as concentrações e destas com o controle ($p < 0,05$), sendo que o tratamento controle apresentou média de mortalidade de 15% (Tabela 2). Os inseticidas Acetamiprid e Thiamethoxan causaram mortalidade entre 60% e 78% das fêmeas adultas, não havendo diferença estatística entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

As Figuras (1; 2) mostram o efeito de extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e de *A. sisalana* sobre as ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*. Os extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* apresentaram efeito positivo sobre ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, sendo mais eficiente com o aumento da concentração ($p < 0,05$). Os EMVLF e EMFLF apresentaram maior potencial inseticida sobre as ninfas, com médias de mortalidade 82% e 80%, respectivamente, na concentração de 200 mg/mL,

diferindo ($p < 0,05$) das demais concentrações e do tratamento controle (12%) (Fig. 1 c; d). Os extratos das folhas de *L. ferrea* var. *ferrea* (EAFcf e EMFCf) apresentaram maior efeito inseticida sobre as fêmeas adultas de *D. opuntiae*, pois com a maior concentração (200 mg/mL) causaram a morte de 97% e 81% das fêmeas, respectivamente, e estas médias diferiram ($p < 0,05$) das demais concentrações e do tratamento controle (16% e 19%) (Fig. 1 a; c).

Os EAAs e EHEAs não foram eficientes no controle das ninfas da cochonilha-do-carmim, apresentando médias de mortalidade que variaram de 24% a 48% nas concentrações testadas ($p < 0,05$) (Fig. 2 a; b). Por outro lado, o EHEAs foi mais eficiente no controle das fêmeas adultas, causando mortalidade de 51% a 95%. Este obteve maior potencial inseticida sobre as fêmeas adultas com o aumento das concentrações, e houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as médias das concentrações e do tratamento controle (10%) (Fig. 2 b).

Os valores das concentrações letais dos extratos vegetais e dos inseticidas sobre as ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae* são mostrados na Tabela 3. Os valores de CL_{50} apresentados pelos inseticidas foram bem menores do que os das concentrações (mínima, média e máxima) dos inseticidas testados sobre as ninfas e fêmeas adultas. Os EMVLF e EMFLf apresentaram menores valores de CL_{50} para as ninfas (20 mg/mL e 32 mg/mL, respectivamente), enquanto os menores valores de CL_{50} para as fêmeas adultas foram de 43 mg/mL (EALf) e de 17 mg/mL (EHEAs).

As Figuras 3, 4 e 5 mostram o potencial da associação das CL_{50} dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e de *A. sisalana* com as CL_{50} dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin sobre as ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*. As associações dos extratos com os inseticidas foram eficientes sobre as ninfas e fêmeas adultas, ocorrendo um sinergismo na associação, em geral com o aumento do percentual de mortalidade dos insetos em comparação com os produtos testados isoladamente, sendo que a maior mortalidade da cochonilha foi causada pela associação dos extratos com o inseticida Clorpirifós, apresentando percentual de mortalidade acima de 90%, o qual diferiu dos demais tratamentos e do controle ($p < 0,05$).

4. Discussão

Os inseticidas e os extratos vegetais causaram a morte das ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, nas concentrações testadas. Palacios-Mendonza et al. (2004) e Vigueiras et al. (2009) têm reportado a importância da degradação da cera que recobre o corpo das ninfas e fêmeas adultas da cochonilha-do-carmim por produtos biodegradáveis como detergentes e extratos vegetais, que causam a desidratação e posterior morte de *D. opuntiae*. Foi observada a degradação da cera que reveste o corpo das ninfas e das fêmeas adultas de *D. opuntiae*, após a aplicação dos inseticidas e, principalmente, dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana*, e, conseqüentemente, a desidratação e morte desses insetos (Fig. 6). Esses dados são similares aos relatados por Nobel, (2001) e Flores-Hernández et al.(2006) os quais constataram que os produtos testados no controle de *D. opuntiae* apresentam substâncias específicas que degradam a camada de cera, sendo esta capaz de repelir soluções aquosas e de proteger o inseto.

Embora o uso de inseticidas químicos para a cultura da palma forrageira ainda não tenha sido liberado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil e não existam produtos registrados para o controle da cochonilha-do-carmim, Santos et al. (2006) recomendam para o controle de grandes focos de infestação de *D. opuntiae*, primeiro o corte e a incineração das raquetes contaminadas, e o uso de produtos químicos como: Imidacloprid, Triacloprid, Thiamethoxan, Clorpirifós, Acetamiprid, Carbaryl e Lambacyhalothrin. Desta forma, torna-se necessário estabelecer uma concentração mínima desses inseticidas, visando minimizar os riscos iminentes desses produtos ao meio ambiente, ou para utilizá-los em associação com outras formas de controle. Os inseticidas Thiamethoxan, Clorpirifós, Acetamiprid e Lambacyhalothrin foram eficientes sobre as ninfas e fêmeas adultas, e Clorpirifós apresentou maior potencial de controle da cochonilha-do-carmim, promovendo a morte de mais de 90% dos insetos, a partir da concentração mínima (0,75 mL/L) com CL₅₀ de 0,084 mg/mL para ninfas e fêmeas adultas, após o 10º dia da aplicação. A eficiência de um inseticida químico é determinada pela concentração mínima

necessária para causar a morte do inseto, sendo essa dose variável de acordo com os produtos existentes, diferentes reações fisiológica dos insetos, dentre outras causas. Há poucos estudos sobre os efeitos de inseticidas e a dose mínima para o controle de *D. opuntiae*, sendo os dados encontrados neste trabalho importante para o desenvolvimento de técnicas eficientes no controle deste inseto. Relatos na literatura mostram o efeito do inseticida Agrobion® 400 a 3% sobre *D. opuntiae*, sendo que o inseticida promoveu a morte de 85% e 100% das ninfas e fêmeas adultas, respectivamente (Vigueiras et al., 2009).

Com exceção dos extratos EAAs e EHEAs para as ninfas, todos os demais extratos apresentaram atividade inseticida sobre as ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*, sugerindo que estes são formados por metabólitos primários ou secundários que têm potencial bioinseticida contra o inseto, uma vez que causaram a morte das ninfas e fêmeas adultas nas concentrações testadas. Os vegetais produzem substâncias bioativas que são inofensivas ao homem e meio ambiente e são consideradas fontes alternativas na descoberta de inseticidas naturais (Luna et al., 2005; Omena et al., 2007). Essas substâncias, tais como lectinas, alcalóides, taninos, terpenóides, glicosídeos, fenólicos, fenilpropanóides, entre outros, devem ter propriedades atrativas, deterrentes e inseticida (Mello e Silva-Filho, 2002; Cheng et al., 2007; Melo-Santos et al., 2009; Souza et al., 2011).

Os extratos EMVLf e EMFLf foram os mais eficientes no controle das ninfas, com média de 82% e 80% na concentração 200 mg/mL, respectivamente. Esta ação possivelmente foi mediada pelos metabólitos secundários de origem lipídica, não encontrados nos extratos aquosos testados, pois essas substâncias são extraídas apenas por solventes orgânicos, como o metanol. Os extratos das folhas de *L. ferrea* var. *ferrea* (EAFLf e EMFLf) e EHEAs foram mais bioativos contra as fêmeas adultas, com mortalidade entre 38% a 97% nas concentrações testadas. Vigueiras et al. (2009) constataram resultados semelhantes quando testaram os extratos de *Chenopodium ambrosioides* L., *Mentha piperita* L., *M. viridis* L., *Tagetes erecta* L., e *T. florida* Sweet sobre *D. opuntiae*, com percentual de mortalidade entre 35% a 98% para ninfas e fêmeas adultas. A ação bioinseticida do óleo de Nim foi testada sobre colônias de *D. opuntiae* em plantações de palma, nas concentrações

de 1%, 2% e 3% causando redução significativa dos insetos, com a eliminação da maioria das colônias de *D. opuntiae* sobre os cladódios (Gorlach-Lira e Lira, 2011).

Os extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e de *A. sisalana* podem ser testados em programa de controle da cochonilha em plantações de palma em áreas semiáridas, isolados ou associados a outros métodos de controle, como o controle tradicional, à base de produtos químicos. A associação dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* com os inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin foi eficiente no controle de *D. opuntiae*, em especial, a associação dos extratos com o inseticida Clorpirifós, causando a morte de mais de 90% das ninfas e fêmeas adultas da cochonilha. Os resultados mostram o sinergismo positivo dos produtos no controle do inseto, sendo possível diminuir a concentrações destes e, principalmente, dos inseticidas, visando assim, um menor impacto no ambiente quando os produtos forem testados em plantações de palma infestadas por *D. opuntiae*. Os inseticidas com os princípios ativos piretróide, organofosforado e neonicotinoide foram eficientes contra ninfas e fêmeas adultas da cochonilha do citrus, *Praelongorthezia praelonga* Douglas. As associações dos inseticidas (Bifentrina+Clorpirifós+óleo mineral e Lambacyhalothrin+Metidationa+óleo mineral) provocaram a mortalidade de 91,50% e 95,60%, repectivamente, após o 14º dia de tratamento, o que mostra o efeito sinérgico dos produtos testados (Schinor et al., 2011) e corroboram com os resultados encontrados no nosso trabalho. Portanto, associação das CL₅₀ dos extratos e CL₅₀ dos inseticidas, em particular, com o inseticida Clorpirifós pode substituir o uso do inseticida no controle de grandes infestações de *D. opuntiae* em testes no campo, sendo esta uma opção sugerida para emprego no meio ambiente.

A cochonilha *D. opuntiae* tornou-se uma importante praga para as plantações de palma do Nordeste do Brasil, e em outros países como o México e a África do Sul (Brutsch e Zimmermann, 1993; Santos et al., 2006; Vigueras et al., 2009; Falcão et al., 2013), sendo imprescindível o uso de métodos eficientes de controle pelos agricultores e pecuaristas com o objetivo de minimizar os danos dessa praga nas plantações de *O. ficus-indica*. Os resultados mostram a ação dos extratos de

L. ferrea var. *ferrea* e *A. sisalana* e dos inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin no controle de *D. opuntiae*, isolados ou associados, sendo uma opção viável para o controle da cochonilha-do-carmim nas plantações de *O. ficus-indica*.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da Bolsa de Doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste (BNB) pelo apoio financeiro à pesquisa.

6. Referências

Barreto, A.F., Araújo, E., Bonifácio, B.F., 2010. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. *latifolium* Hutch). Rev. Bras. Agroecol. 5, 207-215.

Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L., 2002. Supplementing spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) based diets with urea-treated straw or oldman saltbush (*Atriplex nummularia*). Effects on intake, digestion and sheep growth. J. Agric. 138, 85-92.

Branco, A., Santos, J.D.G., Pimentel, M.M.A.M., Osuna, J.T.A., Lima, L.S., David, J.M. 2010, D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. Ind. Crop. Prod. 32, 507-510.

Brutsch, M.O., Zimmermann, H.G., 1993. The prickly pear (*Opuntia ficus-indica* [Cactaceae]) in South Africa; utilization of the naturalized weed, and of the cultivated plants. Econ. Bot. 47, 154-

162.

Carvalho, J.C.T., Texeira, J.R.M., Souza, P.J.C., Bastos, J.K., Santos-Filho, D., Sarti, S.J., 1996. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. J. Ethnopharmacol. 53, 175 -178.

Chand, N., Tiwary, R.K., Rohatgi, P.K., 1998. Bibliography resource structure properties of natural cellulosic fibres-an annotated bibliography. J. Mater. Sci. 23, 381-387.

Chavez-Moreno, C.K.A., Tecante, A., Casas, E.A., 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. Biodivers. Conserv. 18, 3337-3355.

Cheng, S.S., Chang, H.T., Wu, C.L., Chang, S.T., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. Bioresour. Technol. 98, 456-459.

Ennouri, M., Fetoui, H., Bourret, E., Zeghal, N., Attia, H., 2006. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. Bioresour. Technol. 97, 1382-1386.

Falcão, H.M, Oliveira, M.T., Mergulhão, A.C., Silva, M.V., Santos, M.G., 2013. Ecophysiological performance of three *Opuntia ficus-indica* cultivars exposed to carmine cochineal under field conditions. Sci. Hortic. 150, 419-424.

Fernandez, M.L., Lin, E.C., Trejo, A., McNamara, D.J., 1992. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low-density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. J. Nutr. 122, 2330-2340.

Flores-Hernández, A., Murillo-Amador, B., Rueda-Puente, E.O., Salazar-Torres, J.C., García-

Hernández, J.L., Troyo-Diéguez, E., 2006. Reproduction of wild cochineal *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae). Rev. Mex. Biodiv. 77, 97-102.

Freitas, A.C.C, Ximenes, N.C.A., Aguiar, J.S., Nascimento, S.C., Lins, T.U.L., Magalhães, L.R., Coelho, C.B.B., Carneiro-da-Cunha, M.G., Gonçalves-Silva, T., Correia, M.T.S., 2012. Biological activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz pod preparations. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2012, 5141-5147.

Gorlach-Lira, K., Lira, B.B., 2011. Utilização do óleo nim para o controle da cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) em palma-forrageira. Pesq. Agropec. Pernamb. 16, 18-22.

Hoffmann, J.H., Moran, V.C., Zimmermann, H.G., 1999. Integrated management of *Opuntia stricta* (Haworth) Haworth (Cactaceae) in South Africa: an enhanced role for two, renowned, insect agents. Afr. Entomol. Mem. 1, 15-20.

Lorenzi, H., 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, quarta ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo.

Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., Santana, A.E.G., 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. J. Ethnopharmacol. 97, 199-206.

Medina, E.M.D., Rodríguez, E.M.R, Romero, C.D., 2007. Chemical characterization of *Opuntia*

dillenii and *Opuntia ficus indica* fruits. Food Chem. 103, 38-45.

Melo-Santos M.A.V., Araújo, A.P., Rios, E.M.M., Regis, L., 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. Biol. Control., 49, 186-191.

Mello, M.O., Silva-Filho, M.C., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. Brazil. J. Plant. Physiol., 14, 71-81.

Nakamura, E.L.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore, J.R.F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. Cancer Lett., 177, 119 -124.

Nobel, P.S., 2001. Ecophysiology of *Opuntia ficus-indica*, in: Mondragón-Jacobo, C., Pérez-González, S. (Eds.), Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) – Plant production and protection paper, Rome, pp. 13-20.

Oliveira, R.L.C., Lins-Neto, E.M.F., Araújo, E.L., Albuquerque, U.P., 2007. Conservation priorities and population struture of woody medicinal plants in an area of Caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). Environ. Monit. Assess., 132, 189-206.

Omena, M.C., Navarro, D.M.A.F., Paula, J.E., Luna, J.S., Lima, M.R.F.; Santana, A.E.G., 2007. Larvicidal activities agaisnst *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. Bioresour. Technol. 98, 2549-2556.

Palacios-Mendonza, C., Nieto-Hernández, R., LlanderaL-Cázares, C., Gonzáles-Hernández, H.,

2004. Efectividad biológica de productos biodegradables para el control dela cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (cockerell) (Homptera: Dactylopiidae). Acta. Zool. Mex. 20, 99-106

Pizarro, A.P.B., Filho, A.M.O., Parente, J.P., Melo, M.T.V., Santos, C.E., Lima, P.R., 1999. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32, 23-29.

Sá, R.A.; Argolo, A.C.C., Napoleão, T.H., Gomes, F.S.; Santos, N.D.L., Melo, C.M.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2009. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. Int. Biodeter. Biodegr. 63, 470-477.

Santos, D.C., Farias, I., Lira, M.A., Santos, M.V.F., Arruda, G.P., Coelho, R.S., Dias, F.M., Melo, J.N., 2006. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Recife.

Santos, J.D.G., Espeleta, A.F.; Branco, A., Assis, S.A., 2013. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. Carbohydr. Polymer. 92, 1997-2001.

Sas Institute. 1999-2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6ix ed. SAS Institute, Cary, NC.

Schinor, E.H., Martelli, I.B., Pacheco, C.A., Azevedo, F.A., 2011. Eficiência de inseticidas no controle de *Praelongorthezia praelonga* em laranjeira doce. Citrus. Res. Technol., 32, 93-102.

Silva, M.G.S., Dubeux Jr., J.C.B., Assis, L.C.S.L.C., Mota, D.L., Silva, L. L.S., Santos, M.V.F., Santos, D.C., 2010. Anatomy of different forage cacti with contrasting insect resistance. J. Arid. Environ. 74, 718-722.

Souza, J.D., Silva, M.B.R., Argolo, A.C.C., Napoleão, T.H., Sá, R.A., Correia, M.T.S, Paiva, P.M.G, Silva, M.D.C., Coelho, L.C.B.B., 2011. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. Int. Biodeter. Biodegr. 65, 696-702.

Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R., 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. Eur. Food. Res. Technol. 212, 396-407.

Vigueiras, A.L., Tovar, J.C. Pelayo-Ortiz, C., 2009. Use of botanicals extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on Cactus Pear. Acta Hort., 811, 299-234.

Vilela, M.S., Ferreira, M.A., Azevedo, M., Modesto, E.C., Farias, I.; Guimarães, A.V., Bispo, S.V., 2010. Effect of processing and feeding strategy of the spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) for lactating cows: Ingestive behavior. Appl. Anim. Behav. Sci., 125, 1-8.

Volchansky, C.R., Hoffmann, J.H., Zimmerman, H.G., 1999. Host-plant affinities of two biotypes of *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae) enhanced prospects for biological control of *Opuntia stricta* (Cactaceae) in South Africa. J. Appl. Ecol., 36, 85-89.

Walker, R.P., Famiani, F., Baldicchi, A., Cruz-Castillo, J.G., Inglese, P., 2011 Changes in enzymes involved in photosynthesis and other metabolic processes in the fruit of *Opuntia ficus-indica* during growth and ripening. Sci. Hortic. 128, 213-219

7. Apêndice

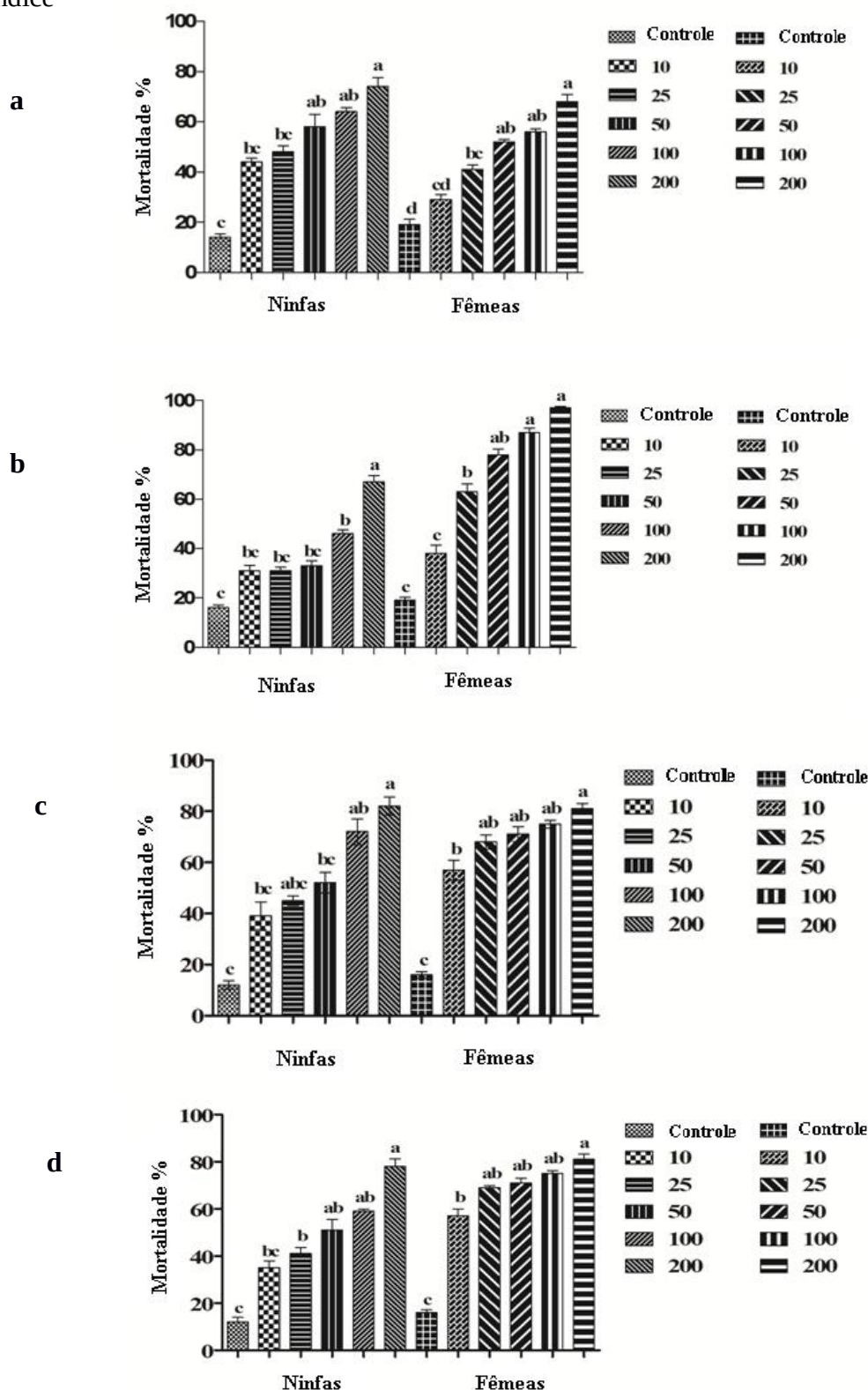
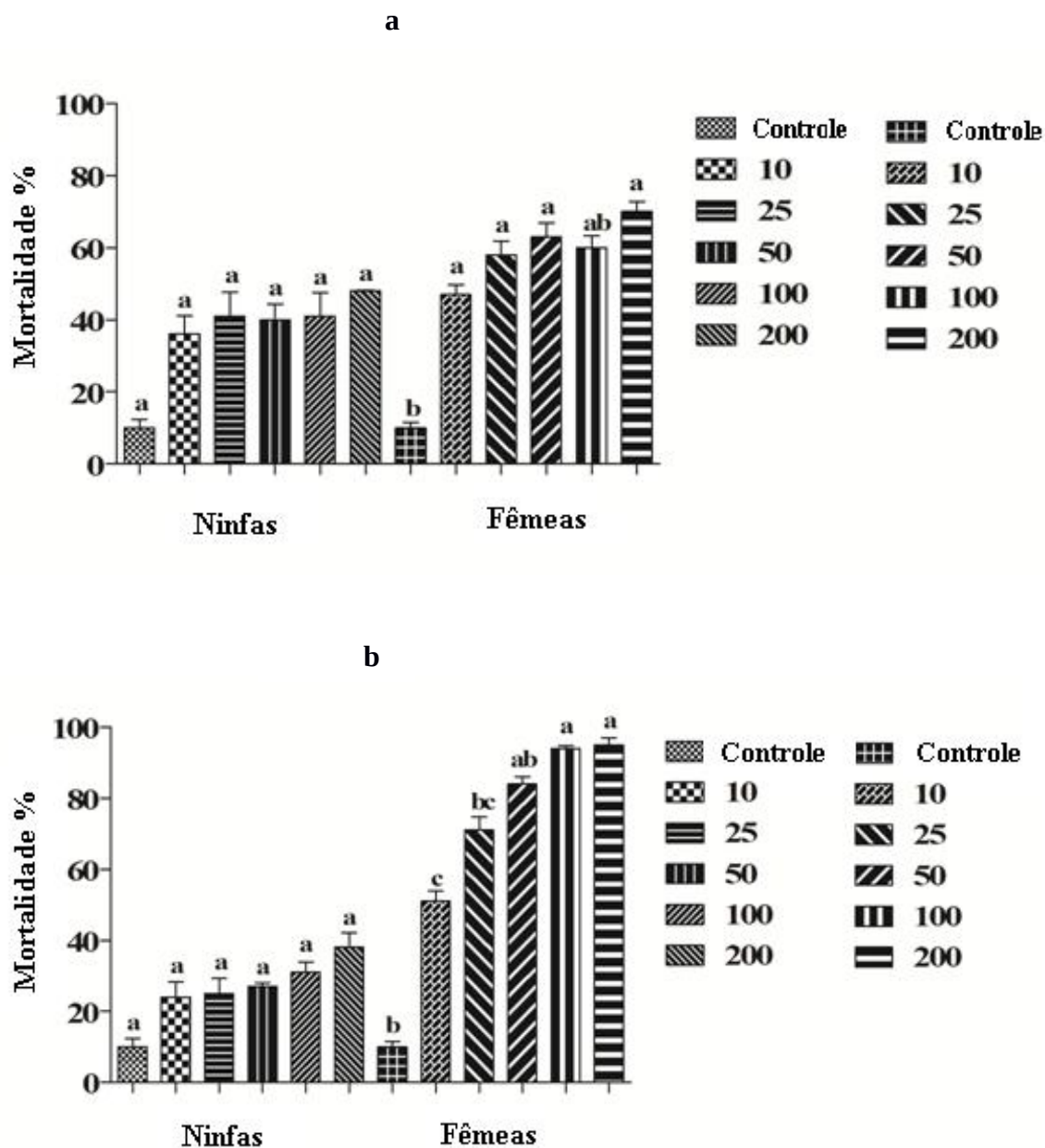


Fig. 1. Mortalidade de ninfas e fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae* tratadas com extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (mg/mL). EAVLf (a); EAFLf (b), EMVLf (c); EMFLf (d).

Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



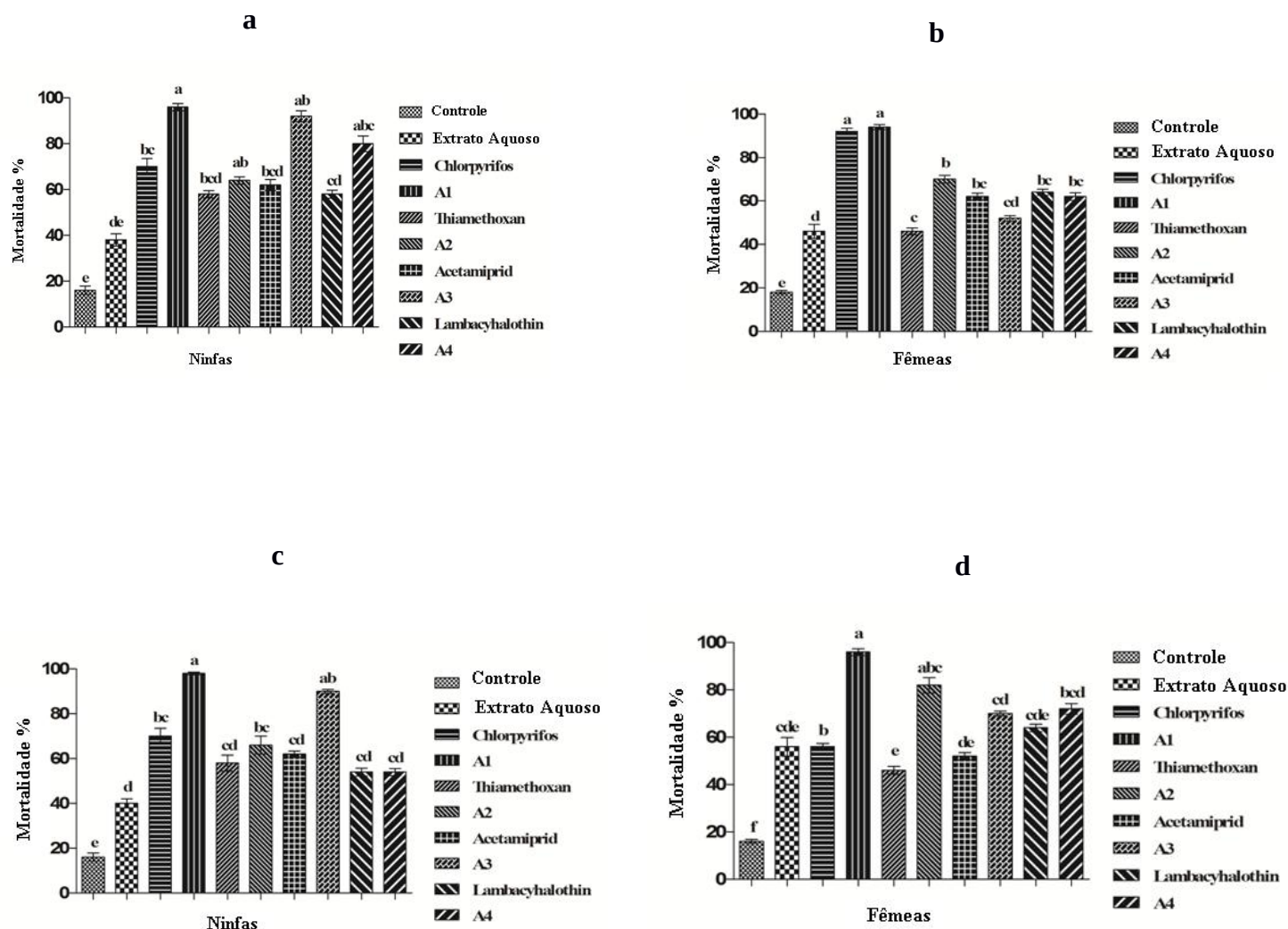


Fig. 3. Efeito da associação de inseticidas com os extratos aquosos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre ninfas e fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae*: EAFLf (a e b) e EAVLf (c e d). Tratamentos: Controle, CL₅₀ dos Extratos, CL₅₀ dos inseticidas e CL₅₀ das associações (A1- extrato+Clorpirifós, A2- extrato+Thiamethoxan, A3-extrato+Acetamiprid e A4-extrato+Lambacyhalothin).

Letras diferentes nas barras diferem estaticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

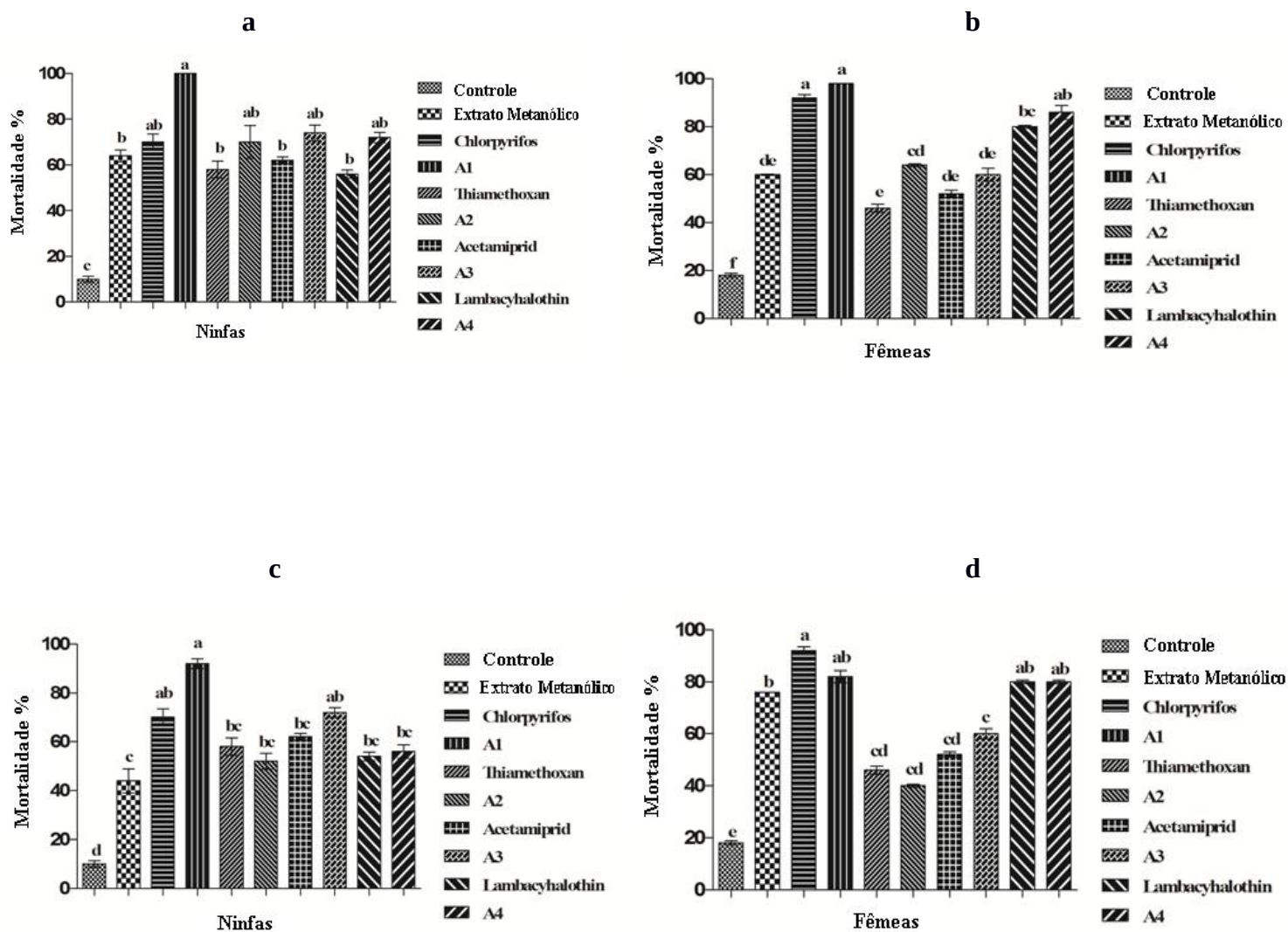


Fig. 4. Efeito da associação de inseticidas com os extratos metanólicos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre ninfas e fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae*: EMFLf (a e b) e EMVLf (c e d). Tratamentos: Controle, CL₅₀ dos Extratos, CL₅₀ dos inseticidas e CL₅₀ das associações (A1- extrato+Clorpirifós, A2- extrato+Thiamethoxan, A3-extrato+Acetamiprid e A4-extrato+Lambacyhalothin).

Letras diferentes nas barras diferem estaticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

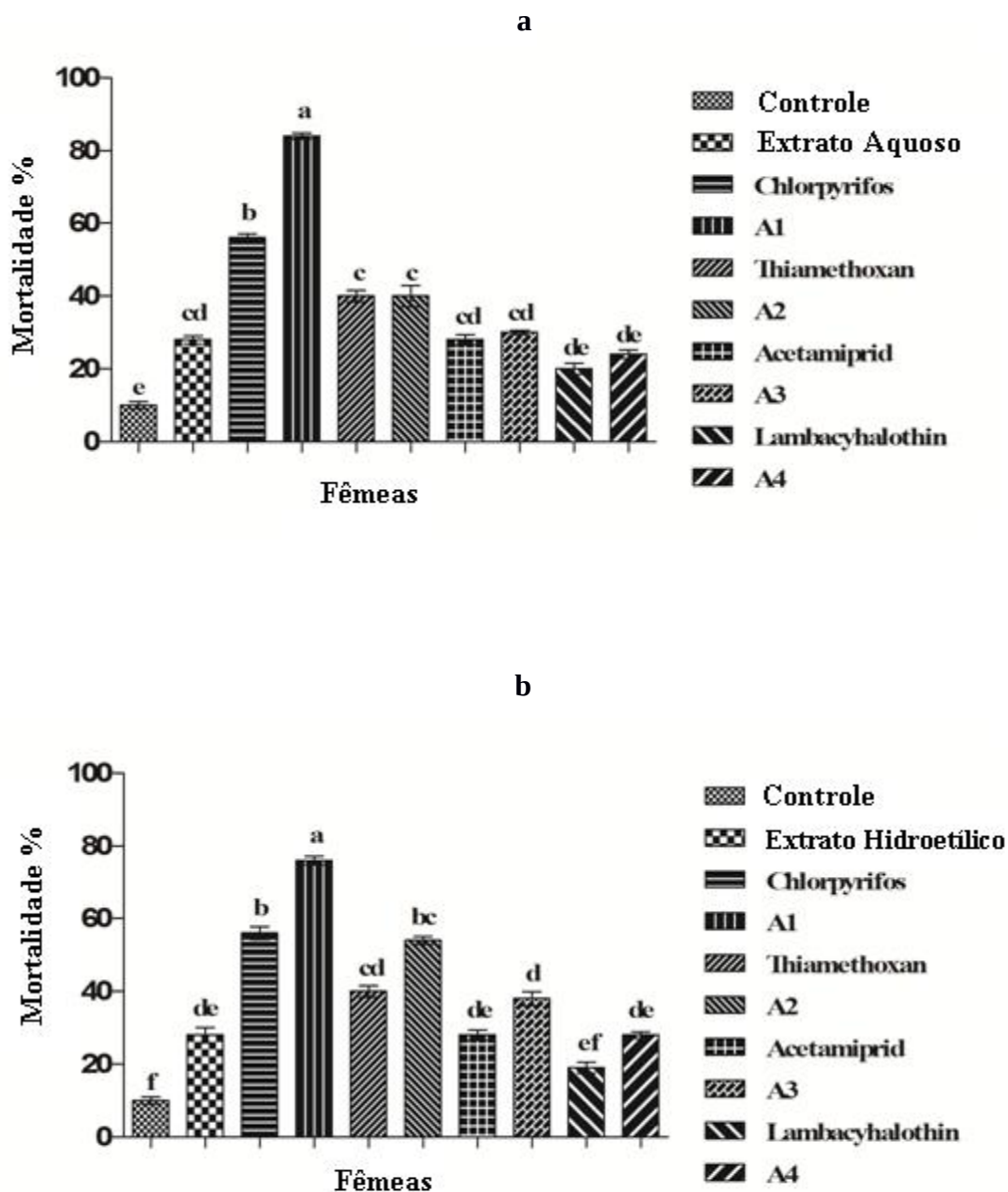


Fig. 5. Efeito da associação de inseticidas com o extrato aquoso (a) e hidroetílico (b) de *Agave sisalana* sobre fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae*. Tratamentos: Controle, CL₅₀ dos Extratos, CL₅₀ dos inseticidas e CL₅₀ das associações (A1- extrato+Clorpirifós, A2-extrato+Thiamethoxan, A3-extrato+Acetamiprid e A4-extrato+Lambacyhalothin).

Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fig. 6. Efeito do extrato aquoso da folha de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre fêmea (a) adulta e ninfas (b) de *Dactylopius opuntiae*.

Tabela 1. Inseticidas utilizados nos experimentos e registrados para o controle de cochonilhas da ordem Hemiptera.

Nome do Produto	Tipo de Formulação	Tipo Químico	Constituinte Ativo	Concentração (L)		
				Mínima	Média	Máxima
Lorsban 480 BR	Concentrado	Organofosforado	Clorpirifós	0,75mL/L	1,5mL/L	3,0mL/L
	Emulsionável					
Mospilan	Pó soluvel	Neonicotinóide	Acetamiprid	0,125g/L	0,25g/L	0,5g/L
Actara 250 WG	Granulado dispersível	Neonicotinóide	Thiamethoxan	0,1g/L	0,2g/L	0,4g/L
Karatê ZEON 250 CS	Suspensão de encapsulado	Piretróide	Lambacyhalothrin	0,5mL/L	1,0mL/L	2,0mL/L

Tabela 2. Percentual de mortalidade de ninfas e fêmeas adultas de *Dactylopius opuntiae* tratadas com os inseticidas, em diferentes concentrações.

Inseticida	Mortalidade (%)							
	Ninfas				Fêmeas adultas			
	Concentração				Concentração			
	Controle	Mínima	Média	Máxima	Controle	Mínima	Média	Máxima
Clorpirifós	8b	93a	97a	100a	15c	92ab	82b	97a
Acetamiprid	8b	60a	70a	75a	15b	60a	68a	70a
Thiamethoxan	8c	64a	80ab	74b	15b	75a	77a	78a
Lambacyhalothrin	8c	53a	67ab	77b	15d	62c	80b	99a
CV(%)	15,45	15,47			CV(%)	5,58		

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Turkey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Concentração Letal (CL₅₀) dos inseticidas químicos e extratos vegetais sobre *Dactylopius opuntiae*

	Ninfas			Fêmeas adultas		
	CL ₅₀ (IC) ¹	Equação de regressão	(χ^2) ²	CL ₅₀ (IC)	Equação de regressão	(χ^2)
Clopirifós	0,084mL/L(0,011-0,062)	Y=6.69896+1.58005*logX	13,30	0,084 mL/L(0,115-0,0598)	Y=6.14107+1.06547*logX	34,83
Acetamiprid	0,883 g/L(0,108-0,070)	Y=6.37602+1.30568*logX	40,66	0,054g/L(0,067-0,038)	Y=6.32907+1.03806*logX	40,66
Thiamethoxan	0,089g/L(0,108-0,724)	Y=6.39356+1.32660*logX	28,82	0,072 g/L(0,094-0,54)	Y=6.04968+0,92081 *logX	14,67
Lambacyhalothrin	0,348mL/L(0,464-0,256)	Y=5.40824+0,89150*logX	40,51	0,127 mL/L(0,169-0,092)	Y=5.93508+1.04520*logX	29,30
Extratos vegetais	Ninfas			Fêmeas adultas		
	CL ₅₀ (IC _{0,05}) (mg/mL)	Equação de regressão	(χ^2)	CL ₅₀ (IC _{0,05}) (mg/mL)	Equação de regressão	(χ^2)
ESVlf	150(240-9,15)	Y=4.92593+0,41688*logX	38,36	46 (8.15-2,80)	Y=4.73885+0,39348*logX	29,05
ESFLf	160(38,36-8,54)	Y=4.56417+0,36212*logX	40,17	43(0,61-0,28)	Y=5.24981+0,68520*logX	77,36
EMVlf	20 (2,82-1,48)	Y=4,79742+0,64363*logX	67,97	50 (0,75-0,33)	Y=5.16841+0,58266 *logX	25,34
EMFLf	32 (4,74-2.24)	Y=5.40824+0,89150*logX	45,64	47/L(0,71-0,29)	Y=5.17571+0,25889*logX	21,65
ESAs	-----	-----	-----	17 (2,51-1,17)	Y=4.87128+0,37508*logX	36,42
EHEAs	-----	-----	-----	46(0,62-033)	Y=5.29697+0,90229*logX	47,96

¹Intervalo de confiança significativo a 95%.

²Teste de qui-quadrado calculado pelo Probit

5.3 CAPÍTULO IV: ARTIGO 3

Ação dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e da associação destes com fungos do gênero *Isaria* no controle de *Nasutitermes corniger*

Artigo a ser submetido ao periódico International Biodeterioration & Biodegradation

Fator de Impacto: 2.234

Ação dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e da associação destes com fungos do gênero *Isaria* no controle de *Nasutitermes corniger*

Rosineide da Silva Lopes¹, Mônica C.B. Martins¹, Antonio Félix da Costa², Maria Tereza dos Santos Correia¹, Nicácio H. Silva¹, Auristela Correia de Albuquerque³ Elza Áurea de Luna Alves Lima^{4*}, Vera Lúcia de Menezes Lima^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil.

² Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martins, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52 171-900 – Recife, PE, Brasil.

⁴ Departamento de Micologia – CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Brasil.

* Autor para correspondência: Fax: +55 81 2126-8540

E-mail: lima.vera.ufpe@gmail.com e elza.aurea@gmail.com

Resumo

Nasutitermes corniger é considerada uma praga nas áreas urbanas, sendo o seu controle realizado com produtos químicos, os quais podem contaminar o homem e o meio ambiente. O trabalho investigou a ação dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e das associações destes, com *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* sobre *N. corniger*; bem como avaliou o potencial dos extratos sobre o crescimento, esporulação e germinação dos conídios dos fungos. Os extratos aquosos da folha (EAFLf) e da vagem (EAVLf) foram mais eficiente que os extratos metanólico da folha e vagem (EMFLf e EMFLf), mostrando atividade termicida sobre o cupim, nas concentrações de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL, quando 100% dos operários foram mortos a partir do 3º e 4º dia, e para os soldados, do 3º ao 6º dia, com valores de CL₅₀ que variaram de 6,20 mg/mL a 8,00 mg/mL para os operários e de 9,50 mg/mL a 14,10 mg/mL para os soldados. Os extratos foram compatíveis com as linhagens fúngicas nas menores concentrações de 10mg/mL, 25mg/mL e 50mg/mL. A associação entre os extratos de EAFLf, EAVLf e *I. farinosa* ESALQ1355 foi eficiente no controle dos operários. Os resultados mostram o potencial de extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* no controle do cupim *in vitro*, sendo esses uma alternativa viável a ser utilizada, isolada ou associada a *I. farinosa* ESALQ1355 no controle e no Manejo Integrado de *N. corniger* em áreas urbanas.

Palavras-Chave: cupim, fungos entomopatogênicos, controle biológico e extratos vegetais.

1. Introdução

Os cupins são insetos sociais pertencentes à Classe Insecta, Ordem Isoptera, representados por castas de indivíduos ápteros e alados, abrigados em cupinzeiros e são importantes no ecossistema, pois contribuem na ciclagem dos nutrientes alocados nas plantas em decomposição, auxiliam na fixação do nitrogênio e são usados como bioindicadores na detecção da qualidade e fertilização do solo (Yamada et al., 2006; Freymann et al., 2008; Verma et al., 2009). No Entanto, poucas espécies são consideradas pragas em áreas urbanas, causando grandes prejuízos nas madeiras de construções e em objetos ou materiais à base de celulose. Estima-se que os gastos com os tratamentos, reparos e substituição de peças atacadas pelos cupins, nas áreas urbanas mundiais, sejam de cerca de cinco a 10 bilhões de dólares por ano (Milano e Fontes, 2002). Nos Estados Unidos, esses insetos causaram prejuízos em madeiras de construções, em torno de três milhões de dólares, em 1997 (Lewis, 1997); e na Ásia foram estimadas perdas econômicas entre 200 e 800 milhões de dólares com os ataques dos cupins em 2001 (Zhong e Liug, 2002). No Brasil, em especial na cidade de São Paulo, os danos econômicos causados pelos cupins podem atingir um custo entre 10 a 20 milhões de dólares anuais (Milano e Fontes, 2002).

Nasutitermes corniger (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) é um cupim arborícola, de distribuição ampla nas Américas, que ocorre desde o Sul do México até o Norte da Argentina, sendo a praga mais importante nas áreas urbanas do Brasil e em boa parte da América do Sul, responsável por enormes danos a peças de madeira. Esse térmita é encontrado em todo o território brasileiro, sendo considerada a mais comum e importante praga do gênero *Nasutitermes* (Milano e Fontes, 2002, Torales, 2002, Albuquerque et al., 2012). Infestações desse inseto são relatadas em vários estados brasileiros, causando danos nas edificações históricas, construções e em troncos de árvores. No Norte e Nordeste do Brasil, *N. corniger* é considerado o principal cupim-praga, com ocorrência nos estados da Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Pará e Amazonas (Milano e Fontes, 2002;

Albuquerque et al., 2012).

O controle dos cupins-praga é realizado convencionalmente por inseticidas organofosforados e piretróides, que são tóxicos aos seres vivos. Essas intervenções são dispendiosas e causam sérios problemas em relação à poluição ambiental, contaminação do homem e o aparecimento de insetos resistentes ao produto químico (Chen et al., 2004). O controle biológico, por meio de agentes entomopatogênicos como extratos vegetais e fungos, tem se mostrado uma alternativa eficiente no controle de insetos-praga.

Os vegetais produzem substâncias bioativas que são inofensivas ao homem e ao meio ambiente, sendo consideradas fontes alternativas na descoberta de inseticidas naturais (Luna et al., 2005; Omena et al., 2007). Assim, a eficiência dos extratos e lectinas sobre os operários e soldados de *N. corniger* tem sido descrita na literatura (Sá et al., 2008; Santana et al., 2010; Paiva et al., 2011; Souza et al., 2011).

Libidibia ferrea (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz. (= *Caesalpinia ferrea*) é uma árvore nativa do Brasil, com ampla distribuição no território, principalmente no Norte e Nordeste (Lorenzi, 2002, Queiroz, 2010). Essa árvore é usada na medicina popular para o tratamento de afecção bronco-pulmonar, diabete, reumatismo, câncer, distúrbio gastrointestinal, inflamação e dor (Bragança, 1996; Hashimoto, 1996; Nakamura, 2002). Também tem atividade antiulcerogênica (Bacchi e Sertié, 1995) e antiinflamatória, bem como, propriedades analgésicas (Carvalho et al., 1996; Freitas et al., 2012).

Pesquisas são desenvolvidas com a utilização de fungos no controle de mais de 200 espécies de insetos economicamente importantes, com resultados satisfatórios (Velásquez et al., 2007). Esses entomopatógenos apresentam alto potencial de disseminação, por meio do contato social entre as castas do cupinzeiro (Grace, 1997). A organização social dos cupins favorece a transferência dos esporos dentro do cupinzeiro, facilitando o controle dos cupins pelas áreas de alimentação (Rath, 2000). Espécies de *Isaria* Persoon apresentam eficiência no controle de térmitas. Linhagens das espécies *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith e *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson &

Hywell-Jones foram patenteadas para o controle dos cupins subterrâneos *Coptotermes formosanus* Shiraki e *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Wright et al., 2003). Meikle et al. (2005) e Yanagawa et al. (2008) constataram a eficácia de *I. fumosorosea* no controle de *C. formosanus*. Linhagens de *I. javanica* mostraram ação patogênica contra operários de *Coptotermes gestroi* Wasmann (Lopes et al., 2011).

Nesse contexto, a possibilidade de se utilizar no Manejo Integrado de Pragas (MIP) a associação de fungos entomopatogênicos com extratos vegetais é viável e pode ampliar a ação desses no controle de pragas, além de reduzir os danos causados ao meio ambiente (Alves, 1998; Dal-Bello et al., 2001). Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial inseticida dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e da associação destes com *Isaria* spp. sobre *N. corniger*, além de avaliar o potencial dos extratos sobre os aspectos biológicos dos fungos.

1. Materiais e Métodos

2.1 *Nasutitermes corniger*

Nasutitermes corniger foi coletado de cupinzeiros localizados no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), estado de Pernambuco/Brasil. A espécie foi identificada no Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Brasil. Após identificação, os operários e os soldados selecionados e com o mesmo estágio de desenvolvimento foram usados nos bioensaios.

2.2 Obtenção dos Extratos vegetais

Folhas e vagens de *L. ferrea* var. *ferrea* foram coletadas de espécimes localizadas na cidade do Recife, Pernambuco/Brasil. As espécies foram identificadas no Departamento de Botânica, do Instituto Agrônomo de Pernambuco/IPA, sendo o material botânico depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima. Após a coleta, o material foi lavado em água destilada para remoção de

impurezas, seco à temperatura ambiente e triturado. Para a obtenção do extrato aquoso das folhas e vagens de *L. ferrea* var. *ferrea* (EAFLf e EAVLf), 20 g das farinhas foram misturados a 80 mL da solução de NaCl 0,15 M para uma concentração final de 20 % (p/v). A suspensão foi agitada 16 horas a 4 °C, depois foi filtrada e o extrato foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Para o extrato metanólico (EMFLf e EMVLf), 20 g das farinhas foram submetidos à infusão metanólica (80 mL) com agitação por 24 horas, sendo a suspensão filtrada e o extrato submetido a um rotoevaporador. Os extratos a 200 mg/mL foram diluídos (solução Tween 80 a 0,1%) até a obtenção das concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 10 mg/mL.

2.3 Eficiência dos extratos sobre *Nasutitermites corniger*

O efeito dos extratos sobre *N. corniger* foi analisado com base no método de Kang et al. (1990) modificado. Discos de papelão (4 cm de diâmetro) foram impregnados com 0,2 mL dos extratos (10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100mg/mL e 200mg/mL) e da solução Tween 80 a 0,1% (controle). Em seguida foram secos à temperatura ambiente, colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) e adicionada a estas, uma porção de algodão umedecido, para manter a umidade, juntamente com um fragmento do cupinzeiro, para servir de abrigo aos insetos. No total, 20 insetos (quatro soldados e 16 operários), proporção indicada por Vasconcellos e Bandeira (2006), foram cuidadosamente transferidos para as placas, mantidos em sala climatizada à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $80 \pm 10\%$ e na ausência de luz. Os experimentos foram efetuados com cinco repetições e a mortalidade dos insetos causada pela ingestão dos extratos foi avaliada diariamente, sendo determinados o percentual de sobrevivência e a Concentração Letal (CL_{50}).

2.4 Espécies de *Isaria* utilizadas nos experimentos

Foi testada uma linhagem de três espécies de *Isaria*, sendo *I. javanica* URM4993 proveniente da Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco, enquanto *I. farinosa* ESALQ1355 e *I. fumosorosea* ESALQ1297 foram cedidas pela Micoteca do Departamento de

Fitossanidade, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Essas linhagens foram selecionadas com base nos dados obtidos por Lopes et al. (2013) (dados não publicados) e revigoradas em operários de *N. corniger*. A viabilidade das mesmas foi determinada pelo percentual de germinação (Tabela 1). Em seguida, as linhagens foram cultivadas em Sabouraud (SAB) (Peptona-Dextrose-Ágar) por 12 dias, e após esse período os conídios de cada linhagem foram transferidos para 10 mL de solução Tween 80 (0,1%) e as suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer para a concentração de 1×10^7 conídios/mL, a qual foi utilizada para os experimentos de compatibilidade com extratos, e para a obtenção dos valores de CL_{50} determinados por Lopes et al. (2013) (dados não publicados) sobre os operários de *N. corniger* (Tabela 1).

2.5 Efeito dos extratos vegetais sobre as linhagens fúngicas

O efeito dos extratos foi avaliado por meio do crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos conídios dos fungos, sendo os experimentos realizados em cinco repetições. Para a avaliação do crescimento e a esporulação, os extratos foram adicionados ao meio Sabouraud (SAB) ainda líquido (45°C), para as concentrações de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL e vertido em placas de Petri autoclavadas. Em seguida, disco de 0,3 mm de papel filtro com 0,01mL da suspensão (1×10^7 conídios/mL) das espécies de *Isaria* foi inoculado, em placa de Petri com SAB acrescido com as concentrações dos extratos e incubadas em BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ UR) por 12 dias, e crescimento micelial foi determinado pelo diâmetro da colônia. Para avaliar a esporulação fúngica, fragmentos dessas colônias foram transferidos para um tubo de ensaio, contendo 10 mL de solução Tween 80 (0,1%). A suspensão foi agitada por aproximadamente dois minutos em Vortex e os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Para avaliação da germinação, os extratos foram adicionados em tubos de ensaio, contendo a solução Tween (0,1%) e a solução Tween sem os extratos foram utilizada como controle. Em seguida, 1 mL da suspensão (1×10^8 conídios/mL) das linhagens foi inoculada em 9 mL de cada concentração e da solução Tween (controle) para a obtenção de suspensões com 1×10^7 conídios/mL. Após uma hora, foi

inoculado 0,1mL das suspensões, separadamente, em placas de Petri contendo SAB e incubadas em BOD ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 10\%$ UR). A germinação foi determinada após 16 horas, por meio da observação de 500 conídios (entre germinados e não germinados), sendo o percentual de germinação calculado pela fórmula ($G=n \times 100/500$), conforme Alves (1998).

2.6 Ação da associação dos extratos vegetais e das *Isaria* spp. sobre *Nasutitermes corniger*

Para o experimento foi associada a CL_{50} de cada extrato com a CL_{50} dos fungos. Discos de papelão (4 cm de diâmetro) foram impregnados com 0,2 mL das suspensões de associação e com os extratos e fungos separadamente, que serviram como controle dos tratamentos. Os discos foram secos à temperatura ambiente e em seguida foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) com 16 operários, sendo mantidos em sala climatizada à temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $\pm 80\%$, na ausência de luz. Os experimentos foram efetuados com cinco repetições e a morte dos insetos determinada após o 4º dia, sendo avaliado o percentual de mortalidade. Para a confirmação da mortalidade dos operários pelos fungos, os mesmos foram desinfestados com álcool 70%, solução de hipoclorito de sódio 4% e em água destilada esterilizada e transferidos para câmara úmida, sendo mantidos em BOD ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\%\pm 10\%$ UR) para confirmação da mortalidade dos operários pelos fungos.

2.7 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme análise de variância (ANOVA) utilizando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute, 1999-2001). As médias das concentrações letais (CL_{50}) foram determinadas por meio do Proc Probit (SAS Institute 1999-2001).

3. Resultados

O contato com os extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* reduziu a sobrevivência dos cupins quando comparado com o tratamento controle, mostrando atividade inseticida significativa contra *N. corniger*. O teste de sobrevivência demonstra que as concentrações testadas dos extratos aquosos de *L. ferrea* var. *ferrea* diferiram do tratamento controle, onde os insetos sobreviveram até o 11º dia.

O EAFLf foi mais ativo, causando a morte de todos os térmitas em três dias, na concentração 50 mg/mL (CL_{50} de 6,10 mg/mL) (Fig. 1a; Tabela 2) para os operários, e para os soldados (CL_{50} 8,10 mg/mL) (Fig. 1b; Tabela 2) e com as demais concentrações os insetos sobreviveram até o 5º dia. O EAVLf causou a morte de 100% dos operários após o 4º dia com a concentração 100 mg/mL (CL_{50} de 7,10 mg/mL) (Fig. 1c; Tabela 2) e promoveu a morte de 100% dos operários (Fig. 1c) a partir do 3º dia (200 mg/mL) e induziu a morte de 100% dos soldados após o 4º dia (50 mg/mL) (Fig. 1 d).

O EMFLf induziu a morte de 100% dos operários e dos soldados com a concentração de 200 mg/mL após o 7º dia do tratamento (Fig. 2a). Da mesma forma, o extrato causou a morte de 100% dos operários após o 9º dia (50 e 100 mg/mL), enquanto os soldados sobreviveram entre 7 e 8 dias (50, 100 200 mg/mL) (Fig. 2 b). O extrato EMVLf promoveu a morte de 100% dos operários após o 8º dia (100 e 200 mg/mL) e as demais concentrações causaram a morte de todos os operários entre 9 e 10º dia (Fig. 2 c), enquanto 100% dos soldados morreram após o 8º dia (100 e 200 mg/mL) e com as demais concentrações, os soldados sobreviveram entre 9º e 11º dia (10, 25, 50 mg/mL) (Fig.2 d). Os valores de CL_{50} de ESMFLf e ESMVLf foram de 12,70 mg/mL e 14,50 mg/mL para os operários e de 28,70 mg/mL e 18,00 mg/mL para os soldados, respectivamente (Tabela 2).

As Tabelas 3 e 4 mostram o efeito dos extratos aquoso e metanólico de *L. ferrea* var. *ferrea* sobre os aspectos biológicos das linhagens fúngicas. Não foi constatada uma diminuição do percentual de germinação dos conídios das linhagens quando testadas com diferentes concentrações

dos extratos, exceto para *I. fumosorosea*, que apresentou diminuição significativa de germinação quando inoculada nas maiores concentrações (50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL). As linhagens obtiveram percentual de germinação entre 54% a 98%, sendo que o índice de germinação do tratamento controle variou entre 92 % a 100%. Os extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* não afetaram o crescimento micelial dos fungos, não sendo constatada diferença estatística entre as médias do crescimento micelial encontradas nos tratamentos dos extratos e do controle. Em geral todos os extratos foram compatíveis com as linhagens nas concentrações 10 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL, sendo que as médias de esporulação não diferiram do tratamento controle (Tabela 3 e 4).

As Figuras 3 e 4 mostram o potencial da associação dos extratos com as linhagens sobre os operários de *N. corniger*. A associação dos extratos de EAFLf, EAVLf com *I. farinosa* ESALQ1355 (Fig. 3a; Fig. 4a) foram eficientes sobre os operários, havendo um aumento significativo do percentual de mortalidade dos insetos, acima de 60%, em comparação com a ação dos extratos e da linhagem testados isoladamente, que diferiram dos demais tratamentos. As associações dos extratos com as linhagens *I. javanica* URM4993 (Fig. 3b; Fig. 4b) e *I. fumosorosea* ESALQ 1297 (Fig. 3c; Fig. 4c) não mostraram efeito sinérgico no controle de *N. corniger*, pois não causaram aumento nos percentuais de mortalidade ocasionada pelas linhagens, não sendo constatada diferença estatística entre os percentuais de mortalidade do inseto nas associações linhagens-extratos e destes testados isoladamente.

4. Discussão

Os cupins são responsáveis pelo ataque e destruição de materiais à base de celulose, como a madeira utilizada nas indústrias de moveleira e de construção civil, bem como várias espécies de árvores e culturas agrícolas, causando sérios prejuízos econômicos. O único método de controle desses insetos é feito por meio de inseticidas químicos, o que pode ocasionar a contaminação do

meio ambiente, dos animais, além de induzir o aparecimento de insetos resistentes a esses produtos químicos.

Para amenizar os danos causados pelo uso de inseticidas, há uma crescente busca por métodos alternativos de controle, entre estes se destacam os testes com fungos entomopatogênicos, óleos essenciais, extratos e lectinas vegetais no controle de espécies de *Nasutitermes* (Hanel, 1982; Milner et al., 1997; Silva et al., 2009; Santana et al., 2010; Souza et al., 2011).

Os dados obtidos sobre a eficiência dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* sugerem que estes contêm compostos primários e secundários com ação inseticida contra operários e soldados de *N. corniger*, pois os mesmos causaram mortalidade de 100% dos insetos. Espécies vegetais resistentes a ataques de cupins são estudadas e podem se tornar agentes no controle desses insetos, por ser uma fonte rica de compostos bioativos com ação de toxicidade, dissuasão de alimentos e repelência (Scheffrahn, 1991; Chen et al., 2004). Estes compostos são inofensivos ao homem e ao meio ambiente, sendo consideradas fontes alternativas na descoberta de inseticidas naturais (Luna et al., 2005; Omena et al., 2007).

A ação inseticida dos EAFLf e EAVLf sobre os operários e soldados de *N. corniger* foi superior a ação dos EMFLf e EMVLf. Esses extratos induziram a mortalidade de 100% dos cupins, a partir da concentração de 10 mg/mL entre cinco e seis dias para os operários, e entre quatro e sete dias para os soldados, sendo que nas demais concentrações todos os insetos sobreviveram entre três e cinco dias, com valores de CL_{50} que variaram de 6,20 a 7,10 mg/mL para os operários e de 14,00 a 14,10 mg/mL para os soldados. O EAFLf foi mais eficaz no controle de *N. corniger*, ocasionando menor tempo de sobrevivência dos insetos e menores valores de CL_{50} . Similarmente, Santana et al. (2010) observaram que *N. corniger* sobreviveu até o 4º dia, quando tratado com extratos de *Bowdichia virgilioides* Kunth, na concentração de 100 mg/L (CL_{50} 7,2 mg/mL), enquanto que o extrato etil acetato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, nas concentrações de 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL (CL_{50} 17,3mg/mL), promoveram a morte de 100% dos insetos após sete dias de tratamento. Também Soares et al. (2008) testaram o efeito dos extratos de Nim e de citronela (1

mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL) e verificaram que o extrato de Nim foi mais eficiente, pois apresentou maior percentual de mortalidade sobre *N. corniger* no 3º dia de tratamento. Pesquisas constataram que o composto primário, a lectina isolada de *Crataeva tapia* L. foi eficaz inseticida sobre os operários de *N. corniger*, causando a morte de todos os insetos após o 6º dia (CL_{50} 0,475mg/mL) (Araújo et al., 2012).

A atividade inseticida dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* pode ser explicada pela toxicidade apresentada pelos seus compostos primários e secundários. Estudos químicos anteriores dos extratos de folha, caule e casca de *L. ferrea* var. *ferrea* relataram a presença de flavonóides, saponinas, taninos coumarinas, esteróides e compostos fenólicos (Gonzales et al., 2004). Compostos bioativos tais como alcalóides, taninos, terpenóides, glicosídeos, fenólicos e fenilpropanóides podem ter propriedades atrativas, deterrentes e inseticida (Mello e Silva-Filho, 2002; Cheng et al., 2007; Melo-Santos et al., 2009). Os flavonóides têm potencial para controlar cupins e são largamente distribuídos nas espécies vegetais, sendo que pesquisas demonstram que há uma relação significativa entre os compostos antioxidantes, como os flavonóides, e as espécies de cupins (Ohmura et al., 2000). Os metabólitos primários tais como lectinas, um tipo de proteína, vêm sendo testada no controle de *N. corniger*, em laboratório. As lectinas extraídas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All causaram a mortalidade de 100% dos operários (CL_{50} 0,374 mg/mL e 0,974 mg/mL) e dos soldados (CL_{50} 0,432 mg/mL e 0,787 mg/mL) desse inseto-praga (Napoleão et al., 2011). Do mesmo modo, a lectina extraída do vegetal *Bauhinia monandra* Kurz mostrou atividade termicida sobre os operários e soldados do cupim arborícola após o 12º dia (CL_{50} 0,09 mg/mL e 0,395 mg/mL), tendo potencial biotecnológico para o controle de pragas agrícolas (Souza et al., 2011). A maior eficiência dos extratos aquosos de *L. ferrea* var. *ferrea* em relação aos extratos metanólicos sobre *N. corniger* pode está relacionada com os diferentes compostos primários e secundários e suas quantidades encontradas nos extratos testados. No entanto, os dados acima descritos indicam que os extratos contêm compostos com ação tóxica ou antialimentar contra os operários e soldados de *N. corniger*.

Os fungos podem infectar todos os estágios do ciclo de vida dos insetos, tendo como via principal o seu tegumento (Charnley 1984; Hajek e St Leger, 1994; Alves, 1998). Eles podem controlar insetos-praga, sendo candidatos relevantes na manutenção do equilíbrio ecológico. Assim, a seleção desses fungos é uma das etapas mais importantes para a determinação da virulência, aspectos reprodutivos e produção em meio de cultura artificial, visando sua utilização como bioinseticida (Alves, 1998). Lopes et al. (2013) (dados não publicados) comprovaram a patogenicidade de *I. farinosa* ESALQ1355, *I. fumosorosea* ESALQ1297 e *I. javanica* URM4993 sobre *N. corniger*. O efeito desses patógenos pode ser potencializado com a associação a outras formas de controle, como o uso de extratos vegetais, sendo necessário inferir quais os produtos e concentrações mais compatíveis com os fungos, visando à utilização desses em conjunto no controle de insetos-praga.

Os extratos foram compatíveis com as linhagens fúngicas nas menores concentrações (10 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL), com médias de esporulação, germinação e crescimento que não diferiram do tratamento controle. A compatibilidade de fungos entomopatogênicos com outros produtos usados no controle de insetos, como inseticidas ou extratos vegetais, é importante para a utilização da associação desses produtos com os fungos no controle de insetos-praga. Neste sentido, Demirci et al. (2011) testaram o efeito de alguns produtos químicos sobre o crescimento micelial e a germinação conidial de *I. farinosa* e constataram que os produtos sistêmicos Astebuconazole, Penconazol e Nuarimol não afetaram a germinação de conídios e o crescimento micelial, sendo estes resultados similares aos obtidos em nosso trabalho. Da mesma forma, Gurulingappa et al. (2011) testaram a ação nove inseticidas sobre *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Gams & Zare e verificaram que Thiamethoxan e Acetamiprid não afetaram a germinação dos conídios e o crescimento micelial do fungo. Amjad et al. (2012) também observaram que o crescimento e a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* e *Lecanicillium muscarium* (Zimmerman) Viegas variaram conforme a concentração e natureza dos nove pesticidas testados, sendo Azocyclotin o

mais tóxico para a germinação dos conídios dos fungos; e o Acetamiprid foi o mais compatível e menos tóxico pesticida sobre *I. fumosorosea*. A ação do óleo de *Azadirachta indica* A. Juss. sobre o crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill e *I. farinosa* foi analisada, sendo que o óleo reduziu o crescimento e esporulação, mas não afetou a viabilidade dos fungos (Marques et al., 2004). A lectina de *B. monandra* (BmoRoL) mostrou atividade antifúngica contra cinco espécies fitopatogênicas de *Fusarium*, reduzindo o crescimento micelial dos fungos, principalmente de *Fusarium solani* (Mart.) Saccardo (Souza et al. 2011).

As associações dos extratos EAFLf e EAVLf com *I. farinosa* ESALQ1355 aumentaram o potencial de patogenicidade do fungo sobre os operários do cupim, sendo que o percentual de mortalidade causado pela linhagem na associação variaram de 68% a 71%, enquanto que a linhagem isolada causou morte confirmada de 53% dos operários. Estes dados demonstram que os extratos potencializaram a infectividade da linhagem sobre o cupim, tornando-a mais patogênica quando usada na concentração de $6,66 \times 10^4$ conídios/mL, acrescida com os CL_{50} dos extratos. Os compostos secundários contidos nos extratos vegetais podem ser tóxicos, repelentes ou diminuir o hábito alimentar dos cupins (Scheffrahn, 1991; Chen et al, 2004). Assim, o uso dos extratos na associação com *I. farinosa* ESALQ1355 pode ter causado estresse sobre os cupins e facilitado a penetração dos esporos da linhagem no tegumento dos operários. Contudo, Alves (1998) relatou o uso de iscas com fungos entomopatogênicos, associados ou não a inseticidas, no controle de cupins, onde estes foram estressados pelo inseticida, tornando-se mais vulneráveis ao patógeno. Após a morte do inseto, o fungo foi facilmente dispersado pelos conídios a outros cupins existentes na área de alimentação. A produção desses conídios é uma característica importante na disseminação e permanência desses patógenos nas colônias de cupins, devido ao contato social que permite a transferência dos conídios para os cupins sadios, além de aumentar o potencial do inóculo no ambiente do hospedeiro (Lopes et al, 2011). Portanto, a associação de fungos entomopatogênicos com inseticidas químicos ou extratos vegetais pode ampliar a ação desses no controle de pragas e

diminuir os danos causados ao meio ambiente (Alves, 1998; Dal-Bello et al., 2001; Amjad et al., 2012), sendo o aumento do potencial fúngico no controle de *N. corniger* visto quando *I. farinosa* ESALQ1355 foi associada aos extratos aquosos de *L. ferrea* var. *ferrea*, corroborando com os relatos da literatura sobre o sinergismo das associações dos agentes entomopatogênicos no controle de insetos. No controle integrado, fungos entomopatogênicos e produtos de controle como os inseticidas seletivos pode agir sinergicamente aumentando a eficiência do controle, sendo que as baixas doses do produtos podem preservar os inimigos naturais das pragas, amenizar a poluição ambiental e o aparecimento de insetos resistentes (Alves, 1998; Ambethgar, 2009).

O cupim *N. corniger* é uma praga severa nas áreas urbanas mundiais, sendo importante o uso de métodos eficazes de controle desse inseto, visando o equilíbrio com o meio ambiente, pela diminuição do uso de inseticidas químicos. Os resultados mostram a ação termicida dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* sobre os soldados e operários de *N. corniger*, e o potencial da associação dos EAFLf e EAVLf com *I. farinosa* ESALQ1355 sobre os operários do cupim. Desta forma, esses agentes entomopatogênicos são viáveis e podem ser usados no controle de *N. corniger*, nas áreas urbanas.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pelo apoio no desenvolvimento dessa pesquisa. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da Bolsa de Doutorado ao primeiro autor. Ao Conselho Nacional de Pesquisas Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), pelo apoio financeiro à pesquisa.

6. Referências

Albuquerque, A.C., Matias, G.R.R.S., Couto, A.V.O., Oliveira, M.A.P., Vasconcellos, A., 2012. Urban termites of Recife, Northeast Brazil (Isoptera). *Sociobiology* 59, 183-188.

Alves, S.B., 1998. Controle microbiano dos insetos. Piracicaba, Brasil.

Ambethar, V., 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *Journal of Biopesticides* 2, 177-193.

Amjad, M, Bashir, M. H., Afzal, M., Sabri, M.A., Javed, N., 2012. Effects of commercial pesticides against cotton whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) and mites (*Tetranychus urticae* Koch) on growth and conidial germination of two species of entomopathogenic fungi. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences* 10, 22-27.

Araújo, R.M.S., Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Cunha, M.G.C., Coelho, C.B.B., Correia, M.T.S., Oliva, M.L.V., Paiva, P.M.G., 2012. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant Science* 183, 20-26.

Bacchi, E.M., Sertié, J.A., 1995. Anti-ulceration and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica* 61, 204-207.

Bragança, L.A.R., 1996. Plantas medicinais antidiabéticas. Niterói, Brasil.

Carvalho, J.C.T., Texeira, J.R.M., Souza, P.J.C., Bastos, J.K., Santos-Filho, D., Sarti, S.J.,

1996. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology* 53, 175 -178.

Charnley, A.K., 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. In: Anderson, J.M., Raymor, A.D.M., Walton, D.W.H. (Eds.) *Invertebrate microbial interactions*. Cambridge University Press, Vol. 6, Cambridge, pp 229-270.

Chen, K., Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M., 2004. Termite feeding deterrent from Japanese Larch wood. *Bioresource Technology* 95, 129-134.

Cheng, S.S., Chang, H.T., Wu, C.L., Chang, S.T., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology* 98, 456-459.

Dal-Bello, G., Padin, S., López-Lastra, C., Fabrizio, M., 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. *Journal of Stored Products Research* 37, 77-84.

Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M.B., Ulgentur, S., 2011. Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. *Phytoparasitica* 39, 353-360.

Freitas, A.C.C, Ximenes, N.C.A., Aguiar, J.S., Nascimento S.C., Lins, T.U.L., Magalhães, L.R., Coelho, C.B.B., Carneiro-da-Cunha, M.G., Gonçalves-Silva, T., Correia, M.T.S., 2012. Biological activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz pod preparations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 5141-5147.

Freyman, B.P., Buitenwerf, R., Souza, O.G., Olf, H., 2008. The importance of termites (Isoptera) for the recycling of herbivore dung in tropical ecosystems: a review. *European Journal of Entomology* 105, 165-173.

Grace, J.K., 1997. Biological control strategies for suppression of termites. *Journal of Agricultural Entomology* 14, 281-289.

Gonzales, F.G., Barros, S.B.M., Bach, E.M., 2004. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 40, 79.

Gurulingappa, P., Gee, M.P., Sword, G.A., 2011. In vitro and in planta compatibility of insecticides and the endophytic entomopathogen, *Lecanicillium lecanii*. *Mycopathologia* 172, 161-168.

Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology* 39, 293-322.

Hanel, H.A., 1982. Selection of a fungus species, suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). *Zeitschrift Angewandte Entomologie* 94, 237-245.

Hashimoto, G., 1996. Illustrated encyclopedia of Brazilian medicinal plants. Abokk Press. Kamakura.

Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests

of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). Mokuzai Gakkaishi 36, 78-84.

Lewis, V.R., 1997. Alternative control strategies for termites. Journal of Agricultural Entomology 14, 291-307.

Lopes, R.S., Svedese, V.M., Portela, A.P.A.S., Albuquerque, A.C., Luna-Alves Lima, E.A., 2011. Virulence and biological aspects of *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones in *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). Arquivos do Instituto Biológico 78, 565-572.

Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Instituto Plantarum, São Paulo.

Luna, J.S, Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., Sant'Ana A.E.G., 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. Journal of Ethnopharmacology 97, 199-206.

Marques, R.P., Monteiro, A.C., Pereira, G.T., 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). Ciência Rural 34, 1675-1689.

Meikle, W.G., Mercadier, G., Rosengaus, R.B., Kirk, A.A., Derouané, F., Quimby, P.C., 2005. Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Deuteromycota: Hyphomycetes) obtained from formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). Journal of Applied Entomology 126, 315-322.

Melo-Santos, M.A.V., Araújo, A.P., Rios, E.M.M., Regis, L., 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biological Control* 49, 186-191.

Mello, M.O., Silva-Filho, M.C., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brasilian Journal of Plant Pysiology* 14, 71-81.

Milano, S.E., Fontes, L. R., 2002. Termite pests and their control in urban Brazil. *Sociobiology* 40, 163-177.

Milner, R.J., Staples, J.A., Lutton, G.G., 1997. The effect of humidity on germination and infection of termites by Hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 64-69.

Nakamura, E.L.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore Jr, F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* Mart and related compounds. *Cancer Letter* 177, 119-124.

Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Lima, T.A.; Santos, N.D.L., Sá, R.A., Albuquerque, A.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 52-59.

Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M., 2000. Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Wood*

Science 46, 149-153.

Omena, M.C., Navarro, D.M.A.F., Paula, J.E., Luna, J.S., Lima, M.R.F.; Santana, A.E.G., 2007. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. Bioresource Technology 98, 2549-2556.

Paiva, P.M.G., Santana, G.M.S.; Souza, I.F.A.C., Albuquerque, L.P., Agraneto, A.C., Albuquerque, A.C., Luz, L.A. Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2011. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. International Biodeterioration & Biodegradation 65, 982-989.

Queiroz, L.P., 2010. New combinations in *Libidibia* (Dc.) Schltdl., and *Poiciella* Britto & Rose (Legumiosae, Caesalpiioideae). Neodiversity 5, 11-12.

Rath, A.C., 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. Biological Science and Technology 10, 563-581.

Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Luana C.B.B., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. International Biodeterioration & Biodegradation 62, 460-464.

Santana, A.L.B.D., Maranhão, C.A., Santos, J.C., Cunha, F.M., Conceição, G.M., Bieber, L.W., Nascimento, M.S., 2010. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. International Biodeterioration and Biodegradation 64, 7-12.

Sas Institute. 1999-2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Scheffrahn, R.H., 1991. Allelochemical resistance of wood to termites. *Sociobiology* 19, 257-282.

Silva, M.D.C., Sá, R.A., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Santos, N.D.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 334-340.

Soares, C.G., Lemos, R.N.S., Cardoso, S.R.S., Medeiros, F.R., Araújo, J.R.G., 2008. Efeito de óleos e extratos aquosos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Cymbopogon winterianus* Jowitt sobre *Nasutitermes corniger* Motschulsk (Isoptera: Termitidae). *Revista Ciências Agrárias* 50, 107-116.

Souza, J.D., Silva, M.B.R., Argolo, A.C.C., Napoleão, T.H., Sá, R.A., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G., Silva, M.D.C., Coelho, L.C.B.B., 2011. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 696-702.

Torales, G.J., 2002. Termites as structural pests in Argentina. *Sociobiology* 40, 191-206.

Vasconcellos, A., Bandeira, A.G., 2006. Populational and reproductive status of a polycalic colony of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) in the urban area of João Pessoa, NE Brazil. *Sociobiology* 47, 165-174.

Velásquez, V.B., Cárcamo, M.P., Meriño, C.M., Iglesias, A.F., Durán, J.G., 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. General Molecular Biology 30, 89-99.

Verma, M., Sharma, S., Prasad, R., 2009. Biological Alternatives for termite control: a review. International Biodeterioration and Biodegradation 63, 959-972.

Zhong, J.H., Liug, L.L., 2002. Termite fauna in China and their economic importance. Sociobiology 40, 25-32.

Wright, M.S., Connick, W.J., Jackson, M.A., 2003. Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.

Yamada, A., Inoue, T., Wiwatwitaya, D., Ohkuma, M., Kudo, T., Sugimoto, A., 2006. Nitrogen fixation by termites in tropical forests Thailand. Ecosystems 9, 75-83.

Yanagawa, A., Yokohari, F., Shimizu, S. 2008. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. Journal of Invertebrate Pathology 97, 165-170.

7. Apêndice

Tabela 1. Linhagens de *Isaria* utilizadas nos experimentos.

Linhagens	Origem	Hospedeiro	Gerrminação (%)	CL ₅₀ (IC) ¹ (mg/mL)
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355	Micoteca/UFRPE	<i>Brassolis sopharea</i>	91	6,66x10 ⁴ (12,47-3,10)
<i>Isaria javanica</i> URM4993	Micoteca/URM	<i>Lonomia obliqua</i>	98	7,22x10 ⁵ (20,25-2,43)
<i>Isaria fumosorosea</i> ESAL1297	Micoteca/UFRPE	<i>Bemisia tabaci</i>	91	4,60x10 ⁵ (13,10-1,38)

¹Intervalo de confiança significativo a 95%.

Tabela 2. Concentração Letal (CL₅₀) dos extratos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre *Nasutitermes corniger*.

	Operários			Soldados		
	CL ₅₀ (IC) ¹ (mg/mL)	Equação de regressão	(χ^2) ²	CL ₅₀ (IC)(mg/L)	Equação de regressão	(χ^2)
EAVLf	7,10 (11,6-2,90)	Y=5.14954+1,00908*logX	28,40	14,10 (20,90-6,90)	Y=4.71308+1.92107*logX	29,05
EAFLf	6,20 (8,40-3,60)	Y=5.49411+2.41777*logX	57,12	14,00(6,50-0,00)	Y=5.9102+1.09267*logX	77,36
EMVLf	14,50 (21,10-4,00)	Y=5.19769+0,033384*log	62,02	28,70 (40,09-18,10)	Y=4.15853+ 1.8367*logX	25,34
EMFLf	12,70 (29,70-2,00)	Y=4.96053+0,36901*logX	75,57	18,00(23,46-4,36)	Y=4.10687+0,98879*logX	21,65

¹Intervalo de confiança significativo a 95%.

² Teste de qui-quadrado calculado pelo Probit

Tabela 3. Efeito dos extratos aquosos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (1×10^7 conídios/mL) das espécies de *Isaria*.

Aspectos Biológicos das Linhagens									
Extrato (mg/mL)	<i>Isaria farinosa</i>			<i>Isaria javanica</i>			<i>Isaria fumosorosea</i>		
	ESALQ1355			UM4993			ESALQ1297		
EAVLf	G ¹	C ²	E ³	G	C	E	G	C	E
Controle	99,45a	4,75a	5,68a	99,20a	3,50c	3,50a	98,13a	33,30a	3,33b
10	97,33a	4,75a	5,284a	96,53a	3,90bc	2,75ab	97,06a	3,79a	2,97b
25	96,53a	4,75a	4,58b	94,66a	3,91bc	1,77bc	95,20a	3,60a	2,85b
50	96,73a	4,93a	3,02c	94,66a	4,46a	1,56bc	96,00a	3,48a	1,37bc
100	92,00a	4,93a	2,88c	94,93a	4,46a	1,35c	92,00a	3,55a	0,00c
200	91,00a	4,98a	0,00d	88,00b	0,00d	0,00d	91,00a	0,00b	0,00c
EAFLf									
Controle	99,20a	4,58a	6,0 8a	98,40a	3,50b	4,56a	98,66a	3,33a	4,00a
10	97,07a	4,55a	5,78 a	96,53a	4,03ab	4,41a	95,73a	3,81a	3,88a
25	98,13a	4,77a	5,284a	94,52a	4,33a	4,33a	97,33a	3,71a	3,81a
50	97,07a	4,53a	4,55b	89,60b	4,56a	4,03a	97,00a	3,53a	3,71a
100	96,80a	4,53a	4,53b	82,13b	4,41a	3,50a	9280ab	4,00a	3,53a
200	95,47a	4,05a	4,05b	54,40d	0,00c	0,00a	87,46b	3,88a	3,33a

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

¹ Germinação, ² Crescimento, ³ Esporulação

Tabela 4. Efeito dos extratos metanólicos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10^7 conídios/mL) das espécies de *Isaria*.

Aspectos Biológicos das Linhagens									
Extrato (mg/mL)	<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355			<i>Isaria javanica</i> UM4993			<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297		
EMVLf	G ¹	C ²	E ³	G	C	E	G	C	E
Controle	99,20a	4,75a	4,58a	98,93a	3,55a	3,00a	98,40a	3,33a	3,86a
10	97,86a	4,75a	4,30a	98,70a	3,45a	2,80a	94,10a	3,79a	3,76a
25	97,86a	4,93a	4,13a	98,50a	3,45a	2,70 ^a	87,73b	3,60a	3,66a
50	95,73a	4,93a	3,95a	97,53a	3,46a	1,70b	87,20b	3,48a	3,50a
100	94,93a	4,98a	2,23b	96,53a	3,53a	1,37b	80,00b	3,48a	0,00b
200	60,00b	0,00a	0,00c	84,26b	3,60a	0,00c	60,80c	0,00a	0,00b
EMFLf									
Controle	99,20a	4,58a	3,95b	98,93a	3,50b	3,86ab	98,40a	3,33a	3,86ab
10	97,33a	4,55a	4,61a	98,40	4,03ab	3,36ab	94,4a	3,81a	3,36ab
25	97,33a	4,70a	4,41ab	97,80	4,33a	3,36ab	98,70a	3,71a	3,36ab
50	96,33a	4,55a	4,40ab	96,53a	4,56a	3,20ab	88,40b	3,55a	3,20ab
100	92,66a	4,55a	4,37b	97,06a	4,41a	3,30b	82,00a	4,00a	3,30b
200	73,33b	4,53a	0,00 c	84,63a	0,00c	1,93c	54,00c	3,88a	1,93c

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

¹ Germinação, ² Crescimento, ³ Esporulação

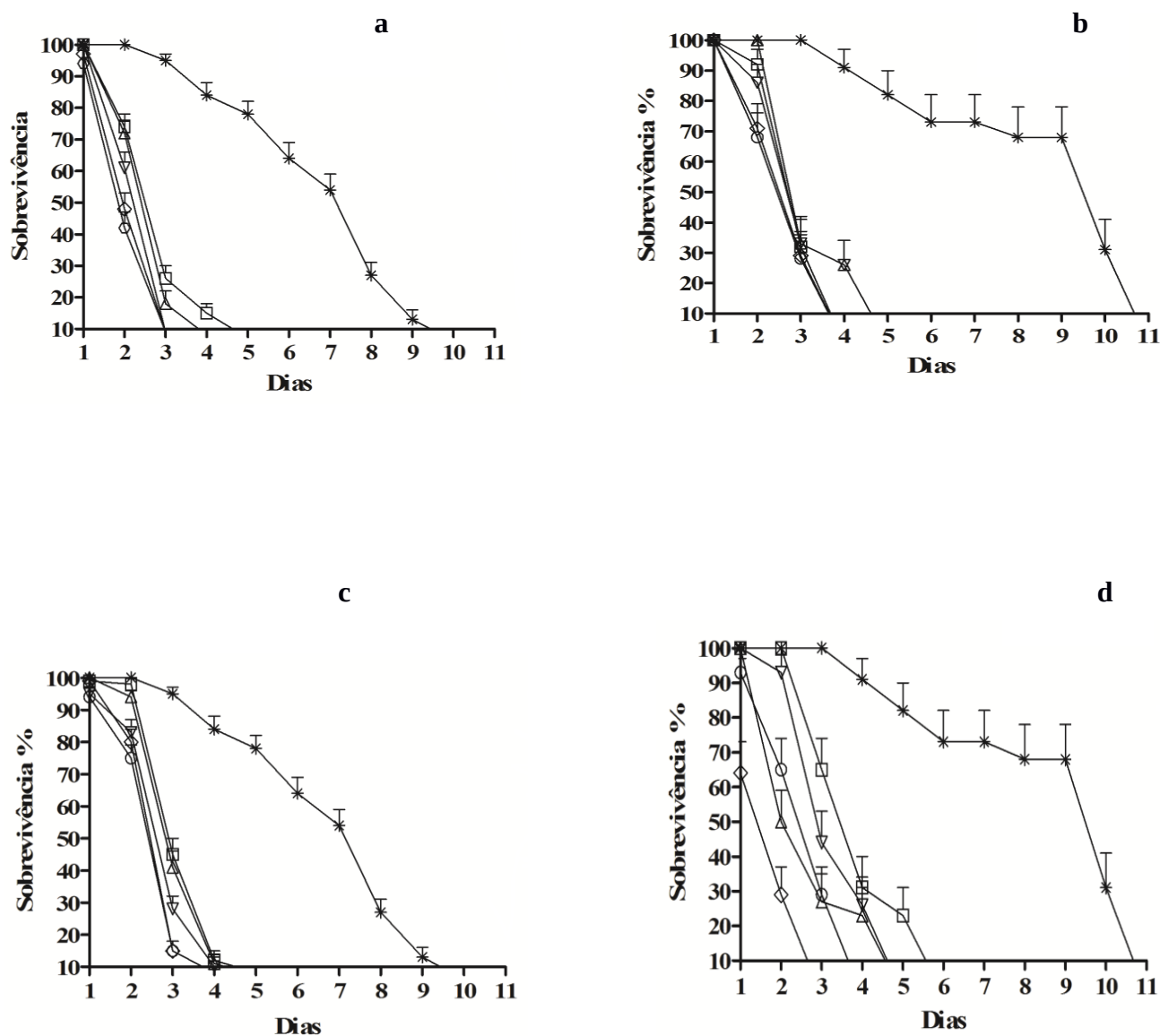


Fig. 1. Percentual de sobrevivência de operários e soldados *Nasutitermes corniger* tratados com os extratos aquosos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: EAFLf sobre operários (a) e soldados (b). EAVLf sobre operários (c) e soldados (d), nas concentrações 10 (⊕), 25 (△), 50 (▽), 100 (◇), 200 mg/L (⊖) e o controle (*). Cada ponto é apresentado como média ± SE das cinco repetições.

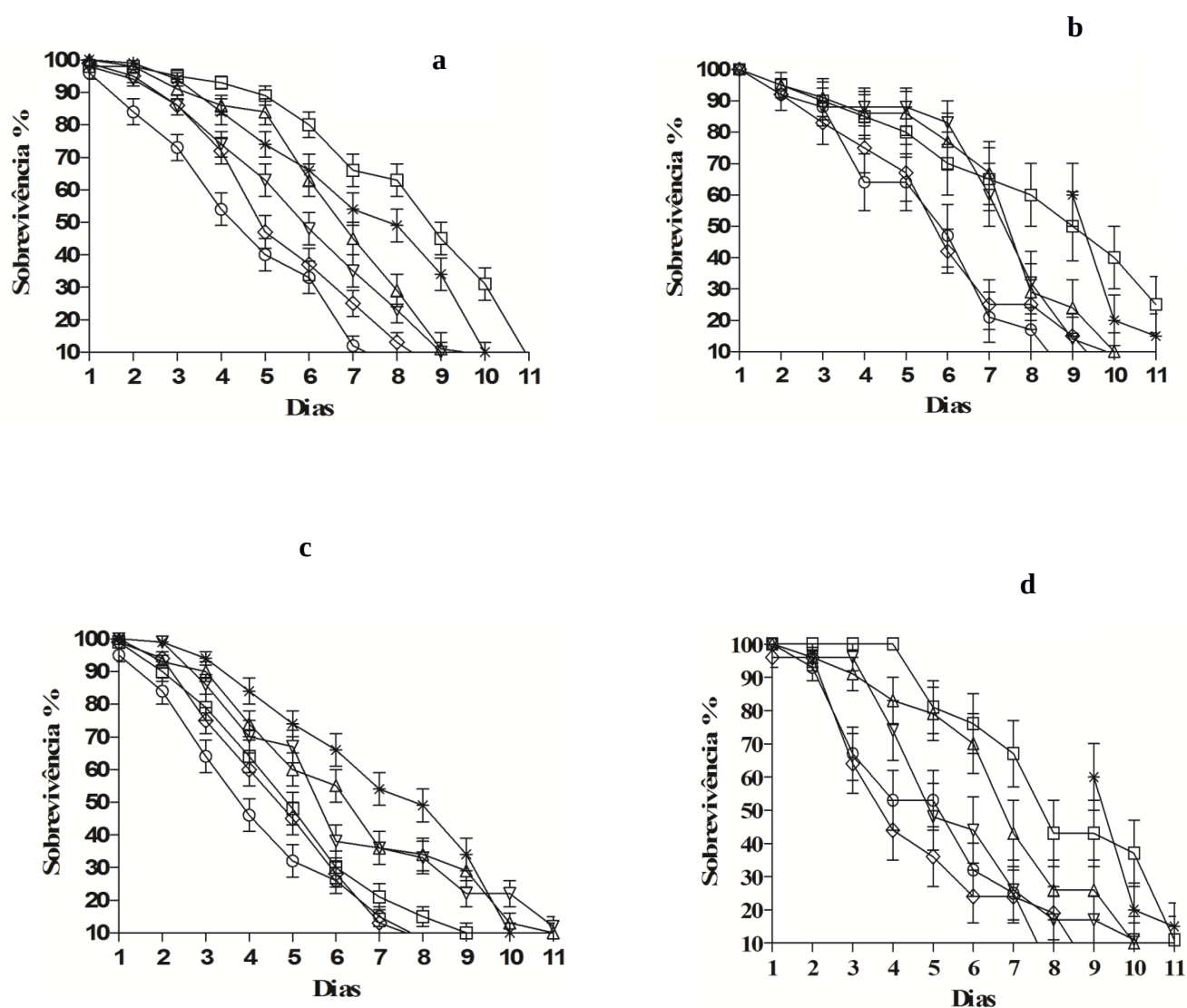


Fig. 2. Percentual de sobrevivência de operários e soldados *Nasutitermes corniger* tratados com os extratos metanólicos de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: ESMFLf sobre operários (a) e soldados (b). EMVLf sobre operários (c) e soldados (d), nas concentrações 10 ($\boxplus$), 25 ($\triangle$), 50 (∇), 100 ($\diamond$), 200 mg/L ($\ominus$) e o controle ($\ast$). Cada ponto é apresentado como média $\pm$ SE das cinco repetições.

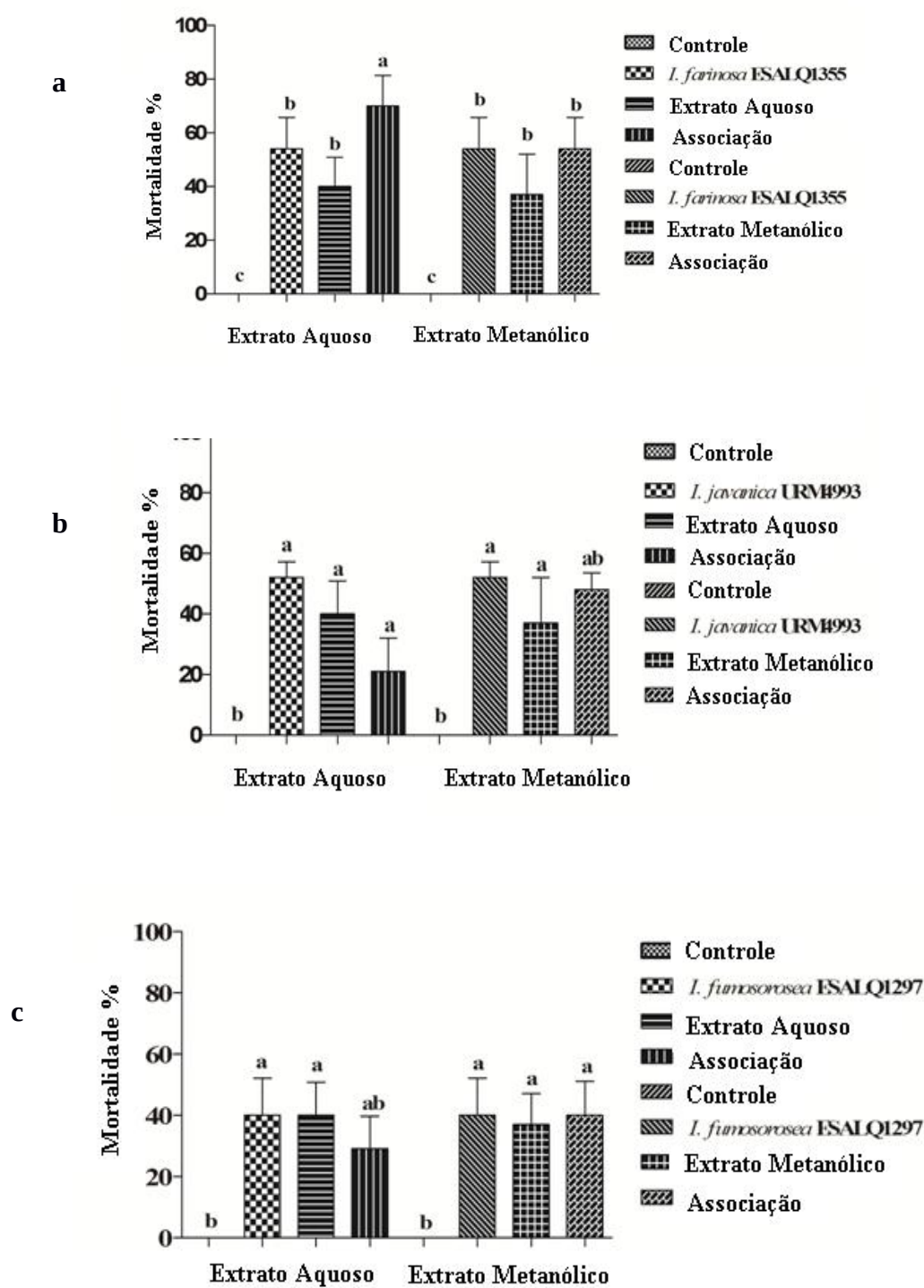


Fig. 3. Efeito da associação das linhagens fúngicas com os extratos de folha (aquoso e metanólico) de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre os operários de *Nasutitermes corniger*: *Isaria farinosa* ESALQ1355 (a), *Isaria javanica* URM4993 (b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297 (c). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

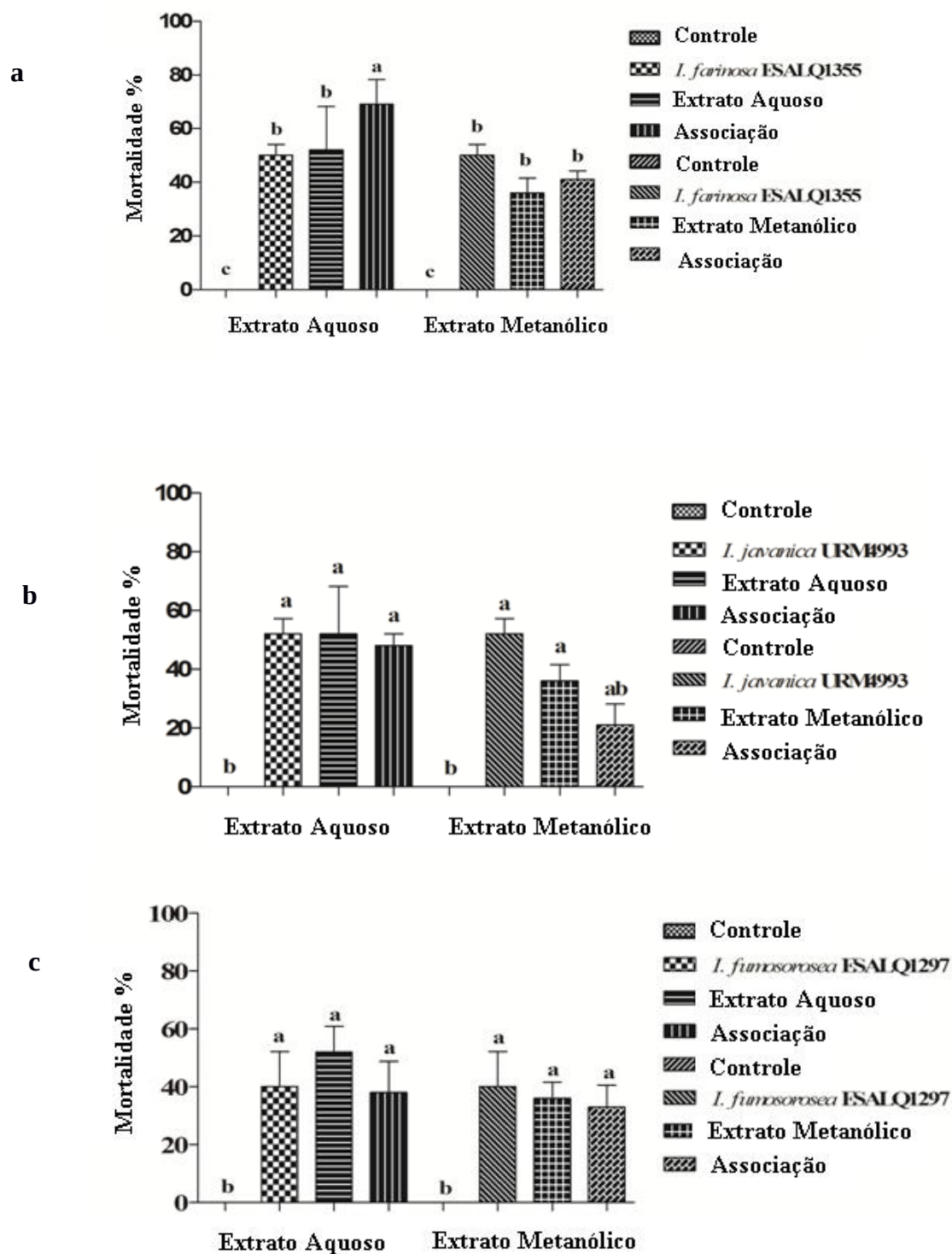


Fig. 4. Efeito da associação das linhagens fúngicas com os extratos de vagem (aquoso e metanólico) de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* sobre os operários de *Nasutitermes corniger*: *Isaria farinosa* ESALQ1355 (a), *Isaria javanica* URM4993 (b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297 (c). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4 CAPÍTULO V: ARTIGO 4

Efeito termiticida dos extratos de *Agave sisalana* e da associação destes com linhagens de *Isaria* no controle de *Nasutitermes corniger*

Artigo a ser submetido ao periódico Biocontrol

Fator de Impacto: 2.253

Efeito termiticida dos extratos de *Agave sisalana* e da associação destes com linhagens de *Isaria* no controle de *Nasutitermes corniger*

Rosineide da Silva Lopes¹, Mônica C.B. Martins¹, Antonio Félix da Costa², Maria Tereza dos Santos Correia¹, Nicácio H. Silva¹, Auristela Correia de Albuquerque³ Elza Áurea de Luna Alves Lima^{4*}, Vera Lúcia de Menezes Lima^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil.

² Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martins, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900 – Recife, PE, Brasil.

⁴ Departamento de Micologia – CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Brasil.

* Autor para correspondência: Fax: +55 81 2126-8540

E-mail: lima.vera.ufpe@gmail.com e elza.aurea@gmail.com

RESUMO

Nasutitermes corniger é um cupim-praga nas áreas urbanas mundiais, sendo controlado por inseticidas que prejudicam homem e o meio ambiente. O trabalho analisou a ação dos extratos aquoso (EAAS) e hidroetílico (EHEAS) de *Agave sisalana* e das associações destes, com *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* sobre *N. corniger* e o efeito dos extratos sobre os fungos. Os extratos foram termicida nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 mg/mL, causando à morte de 100% dos operários entre 3º e 7º dia (CL₅₀: 7,7 a 8,0 mg/mL), e dos soldados, entre 3º e 6º dia (CL₅₀: 9,5 a 9,7 mg/mL). Os extratos foram inofensivos aos fungos nas concentrações 10, 25 e 50 mg/mL. A associação dos extratos com *I. farinosa* ESALQ1355 foi eficiente sobre *N. corniger*. Os dados mostram o potencial dos extratos sobre o cupim, sendo uma técnica a ser usada, isolada ou associada ao fungo sobre *N. corniger*.

Palavras-Chave: agentes entomopatogênicos, extratos vegetais, cupim, sisal, controle biológico.

1. INTRODUÇÃO

Os cupins (Insecta: Isoptera) são insetos sociais que vivem em colônias populosas formadas por castas de indivíduos ápteros e alados, sendo importantes para o ecossistema por contribuírem na ciclagem dos nutrientes alocados nas plantas em decomposição e distribuírem vários nutrientes, como partículas orgânicas e minerais. Também são fixadores de nitrogênio e podem ser usados como bioindicadores na detecção da qualidade e fertilização do solo (Yamada et al. 2006; Freymann et al. 2008; Verma et al. 2009). Poucas espécies são consideradas pragas em áreas urbanas, causando grandes prejuízos nas madeiras de construções e, nos objetos ou materiais a base de celulose. Estima-se que os gastos com os tratamentos, reparos e substituição de peças atacadas pelos cupins, nas áreas urbanas mundiais, são cerca de 5 a 10 bilhões de dólares por ano (Milano e Fontes 2002).

O gênero *Nasutitermes* tem ampla distribuição mundial, sendo o mais rico em variedades de espécies (Kambhampati e Eggleton 2000), com cerca de 200 espécies identificadas e distribuídas nas regiões tropicais, onde constroem ninhos nos troncos, nas raízes das árvores e, acima ou abaixo ao nível do solo (Scheffrahn et al. 2002). *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) é o mais comum e importante inseto-praga do gênero *Nasutitermes*, encontrado amplamente nas Américas, desde Sul do México até o Norte da Argentina, sendo a praga mais importante em áreas urbanas do Brasil e da América do Sul. Esse térmita é encontrado em todo o território brasileiro em especial nos estados do Norte e Nordeste: Piauí, Bahia Paraíba e Pernambuco (Milano e Fontes 2002; Torales 2002; Albuquerque et al. 2012).

O controle dos cupins-praga é feito por inseticidas orfanofosforados e piretróides, os quais são tóxicos aos seres vivos e podem causar sérios problemas, em relação à poluição ambiental, contaminação do homem e o aparecimento de insetos resistentes ao produto químico (Chen et al. 2004). O controle biológico por meio de agentes entomopatogênicos, como fungos e extratos

vegetais vem sendo uma alternativa eficiente no controle de insetos-praga (Alves 1998; Marques et al. 2004).

Os fungos são os principais patógenos de insetos e podem infectar todos os estágios de desenvolvimento do hospedeiro, penetrando por diversas vias, sendo mais eficientes que os demais patógenos que penetram apenas por via oral (Hajek e St. Leger 1994; Alves 1998). Esses patógenos possuem alto potencial de disseminação entre as castas do cupinzeiro (Grace 1997) e a organização social dos cupins favorece a transferência dos esporos dentro do cupinzeiro, facilitando o controle dos insetos por meio das áreas de alimentação (Rath 2000; Lopes et al. 2011). Espécies do gênero *Isaria* Persoon demonstram eficiência no controle de cupins. Linhagens de *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith e *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones são patogênicas aos cupins subterrâneos *Coptotermes formosanus* Shiraki, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Wright et al. 2003; Meikle et al. 2005; Yanagawa et al. 2008; Lopes et al. 2011; Wright e Alan 2013).

Espécies vegetais produzem substâncias com propriedades inseticida que são mais benéficas que os produtos químicos, pois são renováveis, facilmente degradáveis e não contaminam o meio ambiente (Oliveira et al. 2007). Extratos, óleos essenciais e lectinas de vegetais são testados no controle de cupins, sendo a ação dos óleos essenciais de espécies de coníferas constatada sobre *C. formosanus* (Cheng et al. 2007), bem como a atividade termicita de lectinas e extratos vegetais de espécies da fauna brasileira sobre *N. corniger* (Sá et al. 2008; Santana et al. 2010; Paiva et al. 2011; Souza et al. 2011).

Agave sisalana Perrine ex Engelm (Agavaceae), conhecida popularmente como sisal é uma herbácea, originária da América Central e México, sendo encontrada em muitos países tropicais, como a Tanzânia e o Brasil (Chand et al. 1998). O Brasil é o principal produtor de sisal, sendo as fibras obtidas de suas folhas usadas para a confecção de cordas, fios, tapetes e na indústria em geral (Branco et al. 2010; Santos et al. 2013). Os resíduos líquidos e extratos (alcalóides, saponinas e taninos) dessa espécie são eficazes no combate de insetos tais como: as larvas dos mosquitos *Aedes*

aegypti L. e *Culex quinquefasciatus* Say e o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) (Pizarro et al. 1999; Barreto et al. 2010).

A associação dos agentes entomopatogênicos com outras técnicas de controle, como o uso de extratos vegetais é viável e provavelmente deve aumentar a eficiência destes, no controle de insetos-praga, bem como, reduzir os prejuízos causados ao meio ambiente devido ao uso de inseticidas (Alves 1998; Dal-Bello et al. 2001). Neste sentido, o objetivo do trabalho foi analisar o potencial bioinseticida dos extratos de *A. sisalana* e da associação destes com *I. farinosa*, *I. javanica* e *I. fumosorosea* no controle de *N. corniger*, além de avaliar a ação dos extratos sobre o desenvolvimento fúngico (crescimento, esporulação e germinação).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Nasutitermes corniger*

O cupim *N. corniger* foi coletado de cupinzeiros localizados no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), estado de Pernambuco/Brasil. A espécie foi identificada no Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Brasil. Após identificação, os operários e os soldados selecionados com o mesmo estágio de desenvolvimento foram usados nos bioensaios.

2.2 Obtenção dos Extratos vegetais

Folhas de *A. sisalana* foram coletadas em plantações localizadas no Instituto Agrônomo de Pernambuco/IPA. O material botânico foi classificado no Departamento de Botânica e depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do IPA. Após coleta, as folhas foram lavadas em água destilada para remoção de impurezas, secas à temperatura ambiente e, posteriormente trituradas. Para a obtenção do extrato aquoso de *A. sisalana* (EAAs), 20 g do material botânico foram misturados a 80 mL da solução de NaCl 0,15 M para uma concentração final de 200 mg/mL (p/v). A

suspensão foi agitada 16 horas, a 4 °C, em seguida foi filtrada e o extrato submetido à centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Para o extrato hidroetílico (EHEAs), 20 g do vegetal foram submetidos à infusão hidroetílica a 70% (80 mL) durante duas horas, sendo depois filtrado. Em seguida, o álcool foi evaporado por 16 horas à temperatura de 45°C. Os extratos a 200 mg/mL foram diluídos (solução Tween 80 a 0,1%) até a obtenção das concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 10 mg/mL.

2.3 Eficiência dos extratos sobre *Nasutitermites corniger*

A análise da eficiência dos extratos sobre *N. corniger* foi realizada com base no método de Kang et al. (1990). Discos de papelão (4 cm de diâmetro) foram impregnados com 0,2 mL dos extratos (10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL) e da solução Tween 80 a 0,1% (controle), foram secos à temperatura ambiente. Em seguida foram transferidos para placas de Petri (90mm x 15 mm), contendo uma porção de algodão umedecido, para manter a umidade, juntamente com um fragmento do cupinzeiro, que serviu de abrigo aos insetos. No total, obteve-se 20 insetos (quatro soldados e 16 operários), proporção indicada por Vasconcellos e Bandeira (2006). Logo após, foram cuidadosamente transferidos para as placas, mantidos sob temperatura de 26±1°C, umidade relativa ± 80% e na ausência de luz. Os experimentos foram feitos em cinco repetições e a mortalidade dos insetos foi observada diariamente, sendo avaliados o percentual de sobrevivência e a Concentração Letal (CL₅₀).

2.4 Espécies de *Isaria*

Foi testada uma linhagem de três espécies de *Isaria*, sendo *I. javanica* URM4993 proveniente da Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE e; *I. farinosa* ESALQ1355 e *I. fumosorosea* ESALQ1297 foram cedidas pela Micoteca do Departamento de Fitossanidade, da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE (Tabela 1). Essas linhagens foram selecionadas com base nos dados obtidos por Lopes et al. (2013) (dados não publicados),

sendo a viabilidade das mesmas determinada pelo percentual de germinação após o reisolamento de operários de *N. corniger* (Tabela 1). As linhagens foram cultivadas em Sabouraud (SAB) (Peptona-Dextrose-Ágar) por 12 dias, e após esse período, os conídios de cada linhagem foram transferidos para 10 mL de solução Tween 80 (0,1%) e a suspensão foi quantificada em câmara de Neübauer para a concentração de 1×10^7 conídios/mL, a qual foi utilizada para os experimentos de compatibilidade com extratos, e para a obtenção dos valores de CL_{50} determinados por Lopes et al. (2013) (dados não publicados) sobre os operários de *N. corniger* (Tabela 1).

2.5 Efeito dos extratos vegetais sobre os fungos

O efeito dos extratos foi avaliado por meio do crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos fungos, sendo os experimentos realizados em quintuplicada. Para crescimento e esporulação, os extratos foram adicionados ao meio Sabouraud (SAB) ainda líquido (45°C), para as concentrações 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL e vertido para placas de Petri previamente autoclavadas. Em seguida, discos de 0,3 mm de papel filtro com 0,01mL da suspensão (1×10^7 conídios/mL) das espécies de *Isaria* foram inoculados em placa de Petri com SAB, acrescido das concentrações dos extratos e, incubadas em BOD ($26 \pm 1^\circ$ C e $80 \pm 10\%$ UR) por 12 dias, sendo o crescimento micelial determinado pelo diâmetro da colônia. Para avaliar a esporulação fúngica, fragmentos dessas colônias foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução Tween 80 (0,1%). A suspensão foi agitada por aproximadamente dois minutos em Vortex e os esporos foram quantificados em câmara de Neübauer. Para avaliação da germinação, os extratos foram adicionados aos tubos de ensaio, contendo a solução Tween (0, 1%) nas concentrações anteriores e a solução Tween sem os extratos foi utilizado como controle. Em seguida, 1 mL da suspensão (1×10^8 conídios/mL) das linhagens foi inoculado em 9 mL de solução Tween 80 para a obtenção de suspensões com 1×10^7 conídios/mL, após uma hora, foi inoculado 0,1mL das suspensões, separadamente, em placas de Petri contendo SAB e incubadas em BOD ($26 \pm 1^\circ$ C e $80 \pm 10\%$ UR). A germinação foi determinada depois de 16 horas, por meio da

observação de 500 conídios (entre germinados e não germinados) por placa, sendo o percentual de germinação calculado pela fórmula ($G = nx100/500$), conforme Alves (1998).

2.6 Ação da associação dos extratos vegetais e das *Isaria* spp. sobre *Nasutitermes corniger*

Para o experimento foi associada a CL_{50} de cada extrato com a CL_{50} dos fungos e discos de papelão (4 cm de diâmetro) foram impregnados com 0,2 mL destas suspensões e com as dos extratos e dos fungos separadamente, que serviram como controle dos tratamentos. Os discos foram secos à temperatura ambiente e em seguida foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 16 operários, uma porção de algodão umedecido e um fragmento do cupinzeiro. As placas foram mantidas sob temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $\pm 80\%$ e na ausência de luz. Os experimentos foram efetuados em cinco repetições e a mortalidade avaliada após o 4º dia. Para a confirmação da mortalidade dos operários pelos fungos, estes foram desinfetados em álcool etílico a 70%, solução de hipoclorito de sódio 4% e em água destilada esterilizada e transferidos para câmara úmida, conforme Alves (1998), sendo mantidos em BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80\% \pm 10\%$ UR) para confirmação da mortalidade dos insetos pelos fungos.

2.7 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme análise de variância (ANOVA) utilizando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute, 1999-2001). As médias das concentrações letais (CL_{50}) foram determinadas por meio do Proc Probit (SAS Institute 1999-2001).

3. RESULTADOS

O extrato de *A. sisalana* reduziu o índice de sobrevivência dos operários e soldados de *N.*

corniger nas concentrações testadas, diferindo do tratamento controle, no qual os insetos sobreviveram até o 11º dia. Os extratos aquoso (EAAs) e hidroetílico (EHEAs), nas concentrações de 200mg/mL e 100mg/mL promoveram a morte de 100% dos operários após o 3º e 4º dia e, as demais concentrações utilizadas causaram a morte de todos os operários, entre o 5º e o 6º dia (Figura 1a; Figura 1c). Os soldados tratados com o EAAs sobreviveram até o 4º dia quando testados nas concentrações de 50mg/mL, 100 mg/mL e 200mg/mL (Figura 1b), enquanto o EHEAs promoveu a morte de 100% dos soldados após o 5º dia, nas mesmas concentrações (Figura 2d), e com as demais concentrações, os soldados sobreviveram entre o 6º e o 7º dia. Estes dados diferiram significativamente do tratamento controle, pois todos os insetos foram mortos até 11º dia. Os valores de CL₅₀ dos EAAs e EHEAs referentes aos operários e aos soldados foram de 8,0 mg/mL e 7,0 mg/mL, e de 9,7 mg/mL e 9,5 mg/mL, respectivamente (Tabela 2).

A Tabela 3 mostra o efeito dos extratos de *A. sisalana* sobre os aspectos biológicos das linhagens. Não foi constatada diminuição do percentual de germinação dos conídios das linhagens quando testadas com diferentes concentrações dos extratos, exceto para *I. fumosorosea*, que apresentou diminuição significativa de germinação (33%) quando inoculada com a maior concentração do extrato aquoso ($p < 0,05$). O EAAs foi compatível com as linhagens nas menores concentrações (10 mg/mL e 25 mg/mL), sendo que as médias de crescimento micelial e esporulação não diferiram do tratamento controle ($p < 0,05$). Entretanto, o EHEAs promoveu a diminuição do crescimento de *I. farinosa* ESALQ1355 e *I. fumosorosea* ESALQ1927 e foi compatível com *I. javanica* URM4993 nas menores concentrações (10mg/mL e 25mg/mL). Esse extrato também interferiu negativamente na média de esporulação das linhagens, exceto para *I. farinosa* ESALQ1355, sendo o extrato compatível nas concentrações 10mg/mL, 25mg/mL e 50mg/mL, não diferindo da média observado no tratamento controle ($p < 0,05$).

A Figura 2 mostra a atividade termicita da associação dos extratos com as linhagens de *Isaria* sobre os operários de *N. corniger*. A associação dos extratos EAAs e EHEAS com *I. farinosa* ESALQ1355 foram eficientes sobre os operários, causando a morte de cerca de 78% dos indivíduos,

com um aumento significativo da média de mortalidade em comparação com a ação dos extratos aquoso (47%) e hidroetílico (61%) e, da linhagem (53%), todos testados isoladamente ($p < 0,05$) (Figura 2a). Entretanto, as associações dos extratos com as linhagens *I. javanica* URM4993 e *I. fumosorosea* ESALQ1297 não promoveram ação sinérgica no controle de *N. corniger*, pois não causaram aumento nas médias de mortalidade ocasionada pelas linhagens ($p < 0,05$) (Figura 2b; c).

4. DISCUSSÃO

Apesar dos cupins serem considerados importantes para a manutenção do ecossistema, cerca de 10% das espécies causam prejuízos econômicos pelos ataques à madeira utilizada nas indústrias moveleira e de construção civil, bem como as várias espécies de árvores e culturas agrícolas. Atualmente, o uso de inseticidas químicos no controle de cupins é a única alternativa utilizada e pode ocasionar danos irreversíveis ao meio ambiente, ao homem e aos animais.

Pesquisas estão sendo desenvolvidas, em busca de métodos alternativos de controle dos cupins-praga, que possam minimizar os prejuízos causados pelo uso dos inseticidas químicos. Relatos mostram a ação termicida dos agentes entomopatogênicos como fungos, óleos essenciais, extratos e lectinas de espécies vegetais no controle de espécies do gênero *Nasutitermes* (Hanel 1982; Milner et al. 1997; Silva et al. 2009; Santana et al. 2010; Souza et al. 2011).

A pesquisa constatou a eficiência dos extratos de *A. sisalana* sobre *N. corniger*, ao diminuir a sobrevivência dos operários e soldados, podendo-se inferir que os extratos são formados por metabólitos primários e secundários com ação inseticida sobre o cupim. Espécies vegetais são fontes ricas de compostos bioativos, os quais possuem ação de toxicidade, dissuasão de alimentos e repelência sobre os cupins (Scheffrahn 1991; Chen et al. 2004), e são inofensivos ao homem e ao meio ambiente, sendo as plantas fontes alternativas na descoberta desses inseticidas naturais (Luna et al. 2005; Omena et al. 2007).

Os extratos EAAs e EHEAs apresentaram atividade inseticida sobre os operários e soldados de *N. corniger*, pois induziram a mortalidade de 100% dos cupins, a partir da concentração de 10mg/mL entre cinco e seis dias para os operários, e entre quatro e sete dias para os soldados, sendo que nas demais concentrações todos os insetos sobreviveram entre três e cinco dias, com valores de CL_{50} que variaram de 7,0 mg/mL a 8mg/mL para os operários e de 9,5 a 9,7 mg/mL para os soldados. Estes dados corroboram com os obtidos por Santana et al. (2010) ao constatarem a susceptibilidade de *N. corniger* ao extrato *Bowdichia virgilioides* Kunth, sendo que todos os cupins morreram após o 4º dia quando tratados com a concentração de 100 mg/L (CL_{50} 7,2 mg/mL); entretanto, o extrato etil acetato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan promoveu a morte de 100% dos indivíduos após sete dias de tratamento, quando testados nas concentrações de 25 mg/mL, 50mg/mL e 100mg/mL (CL_{50} 17,3mg/mL). Estudos comprovaram que a lectina da casca (CrataBL) de *Crataeva tapia* L. é um eficiente inseticida sobre os operários de *N. corniger*, pois causou mortalidade de todos os indivíduos após o 6º dia de tratamento (CL_{50} 0,475 mg/mL), os quais corroboram com os resultados encontrados neste trabalho (Araújo et al. 2012).

A ação termicida dos extratos de *A. sisalana* deve está relacionada com a toxicidade dos metabólitos primários e secundários que os compõem. Estudos sobre os resíduos líquidos e os extratos de *A. sisalana* demonstraram a atividade inseticida contra larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Pizarro et al. 1999). Compostos bioativos de espécies vegetais, tais como alcalóides, taninos, terpenóides, glicosídeos, fenólicos, flavanoídes e fenilpropanóides podem ter propriedades atrativas, deterrentes e inseticida (Mello e Silva-Filho 2002; Cheng et al. 2009; Melo-Santos et al. 2009). Entre estes, os compostos flavonóides têm potencial inseticida sobre espécies de cupins e são largamente distribuídos nas espécies vegetais (Ohmura et al. 2000). Compostos primários como proteínas (lectinas) têm sido eficiente no controle de *N. corniger*, em laboratório. As lectinas extraídas da casca (MuBL) e do cerne (MuHL) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. foram eficientes sobre esse cupim, causando a morte de 100% dos operários (CL_{50} 0,374mg/mL e 0,974mg/mL) e dos soldados (CL_{50} 0,432 mg/mL e 0,787 mg/mL) (Napoleão et al. 2011). Da

mesma forma, a lectina extraída das raízes de *Bauhinia monandra* Kurz (BmoRoL) apresentou atividade termicida sobre os operários e soldados do cupim arborícola após o 12º dia (CL₅₀ 0,09 mg/mL e 0,395 mg/mL), tendo potencial biotecnológico para o controle de pragas agrícolas (Souza et al. 2011). Os dados acima descritos indicam que os extratos de *A. sisalana* contêm compostos com ação tóxica ou antialimentar contra os operários e soldados de *N. corniger*.

Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes no controle de insetos-praga em ambientes naturais e ecossistema agrícola, sendo relevantes na manutenção do equilíbrio ecológico. A utilização destes, como bioinseticidas requer inicialmente, uma previa seleção das espécies e de linhagens fúngicas, por meio da determinação da virulência, aspectos reprodutivos e produção em meio de cultura artificial (Alves 1998; Ambethgar 2009). Neste sentido, Lopes et al. (2013) (dados não publicados) selecionaram as linhagens *I. farinosa* ESALQ1355, *I. fumosorosea* ESALQ1297 e *I. javanica* URM4993 com as mais patogênicas sobre *N. corniger*. Por outro lado, esses patógenos podem ser associados a outras formas de controle, como o uso de extratos vegetais, visando o aumento do poder infectivo dos fungos, sendo necessário inferir quais os extratos vegetais e concentrações são mais compatíveis com os patógenos, visando à utilização destes, em conjunto no controle de insetos-praga.

De maneira geral, os extratos foram compatíveis com as linhagens fúngicas nas menores concentrações (10 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL), com médias de esporulação, germinação e crescimento, que não diferiram do tratamento controle. A compatibilidade de fungos entomopatogênicos, com outros produtos usados no controle de insetos, tais como inseticidas ou substâncias vegetais é importante na utilização da associação desses produtos com os fungos, visando o controle de insetos-praga. Neste sentido, o efeito do óleo de *Azadirachta indica* A. Juss. sobre o crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill e *I. farinosa* foi estudado, e o óleo reduziu o crescimento e esporulação, mas não afetou a viabilidade dos conídios. (Marques et al. 2004), que diferiram dos dados encontrados nesta pesquisa. Do mesmo

forma, a lectina de *B. monandra* (BmoRoL) mostrou atividade antifúngica contra cinco espécies fitopatogênicas de *Fusarium*, reduzindo o crescimento micelial dos fungos, principalmente de *Fusarium solani* (Mart.) Saccardo (Souza et al. 2011). Também o efeito de alguns produtos químicos sobre o crescimento micelial e a germinação conidial de *I. farinosa* foi constatado, sendo que os produtos Astebuconazole, Penconazol e Nuarimol não afetaram a germinação dos conídios e o crescimento micelial (Demirci et al. 2011). Da mesma forma, Gurulingappa et al. (2011) avaliaram a ação de nove inseticidas sobre *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Gams & Zare e constataram que Thiamethoxan e Acetamiprid não afetaram a germinação dos conídios e o crescimento vegetativo fúngico. O crescimento micelial e a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* e *Lecanicillium muscarium* (Zimmerman) Viegas variaram de acordo com a concentração e natureza dos pesticidas testados, sendo Azocyclotin o mais tóxico para a germinação dos conídios dos fungos; e o Acetamiprid foi o mais compatível e menos tóxico pesticida sobre *I. fumosorosea* (Amjad et al. 2012).

As associações dos extratos EAAs e EHEAS com *I. farinosa* ESALQ1355 aumentaram o potencial de patogenicidade do fungo sobre os operários de *N. corniger*, sendo que o percentual de mortalidade causado pela linhagem na associação foi de 78%, enquanto que a linhagem isolada causou morte confirmada de 53% dos operários e os extratos promoveu a morte de 45% (EAAs) e de 61% (EHEAS). Estes dados demonstram que os extratos potencializaram a infectividade de *I. farinosa* ESALQ1355 sobre o cupim, tornando-a mais patogênica quando usada na concentração de $6,66 \times 10^4$ conídios/mL, acrescida com os CL_{50} dos extratos. Os metabólitos primários e secundários que constituem os extratos vegetais são tóxicos, repelentes ou diminuem o hábito alimentar dos cupins (Scheffrahn 1991; Chen et al. 2004). A associação de extratos vegetais com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas além de reduzir os custos econômicos e os impactos ambientais causados pelo uso dos inseticidas químicos, em programas de controle de insetos-praga (Dal-Bello et al. 2001; Marques et al. 2004; Ambethgar, 2009). Portanto, a associação de *I. farinosa* ESALQ1355 com os extratos de *A. sisalana* pode ter

facilitado a penetração dos conídios, no tegumento dos operários devido ao estresse causado pelos extratos. Estudos mostram que após a morte do inseto por fungos entomopatogênicos, os seus conídios são facilmente dispersados sobre os insetos da colônia (Alves 1998; Lopes et al. 2011). A produção desses conídios é importante no processo de disseminação e permanência dos fungos nas colônias de cupins, uma vez que o comportamento social desses insetos permite a transferência dos conídios, sobre os cupins que compõem a colônia, aumentando o potencial do inóculo no ambiente do inseto-praga (Rath 2000; Lopes et al. 2011). Portanto, a associação de fungos entomopatogênicos, com inseticidas químicos ou extratos vegetais amplia a eficiência dos fungos sobre os insetos-praga e ocasiona a diminuição os danos ao meio ambiente (Alves 1998; Dal-Bello et al. 2001).

O cupim *N. corniger* causa danos severos nas áreas urbanas do Nordeste brasileiro e em outros países, sendo necessária à utilização de técnicas modernas que visem o controle desses insetos e a preservação do meio ambiente, pela diminuição do uso de produtos químicos. Os resultados mostram a atividade inseticida dos extratos de *A. sisalana* sobre os soldados e operários de *N. corniger*, e a eficiência da associação desses extratos com *I. farinosa* ESALQ1355 sobre os operários do cupim, sendo esta forma de controle viável, podendo ser empregada no controle de *N. corniger*.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da Bolsa de Doutorado ao primeiro autor. Ao Conselho Nacional de Pesquisas Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), pelo apoio financeiro à pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

Albuquerque AC, Matias GRRS, Couto AVO, Oliveira MAP, Vasconcellos A (2012) Urban térmites of Recife, Northeast Brazil (Isoptera). *Sociobiology*, 59: 183-188.

Alves SB (1998) Controle microbiano dos insetos. FEALQ, Piracicaba.

Ambethgar V (2009) Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *J. Biopestic.* 2: 177-193.

Amjad M, Bashir MH, Afzal M, Sabri MA, Javed, N (2012) Effects of commercial pesticides against cotton whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) and mites (*Tetranychus urticae* Koch) on growth and conidial germination of two species of entomopathogenic fungi. *Pak. J. Life Soc. Sci.* 10: 22-27.

Araújo RMS, Ferreira RS, Napoleão TH, Cunha MGC, Coelho CBB, Correia MTS, Oliva MLV, Paiva PMG (2012) *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant. Sci.* 183: 20-26.

Barreto AF, Araújo E, Bonifácio BF (2010) Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). *Rev. Bras. Agroecol.* 5: 207-215.

Branco A, Santos JDG, Pimentel MMAM, Osuna JTA, Lima LS, David JM (2010) D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. *Ind. Crop. Prod.* 32: 507-510.

Chand N, Tiwary RK, Rohatgi PK (1998) Bibliography resource structure properties of natural cellulosic fibres - an annotated bibliography. J. Mater. Sci. 23: 381-387.

Chen K, Ohmura W, Doi S, Aoyama M (2004) Termite feeding deterrent from Japanese Larch wood. Bioresour. Technol. 95: 129-134.

Chen PY, Kuo YC, Chen CH, Kuo YH, Lee CK (2009) Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. Molecules. 14: 1789-1795.

Cheng SS, Chang HT, Wu CL, Chang ST (2007). Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. Bioresour. Technol. 98: 456-459.

Dal-Bello G, Padin S, López-Lastra C, Fabrizio M (2001) Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. J. Stored. Prod. Res. 37: 77-84.

Demirci, F, Mustu, M, Kaydan, MB, Ulgentur, S (2011) Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. Phytoparasitica. 39: 353-360.

Grace JK (1997) Biological control strategies for suppression of termites. J. Agric.Entomol. 14: 281-289.

Gurulingappa P, Gee MP, Sword GA (2011) In vitro and in planta compatibility of insecticides and the endophytic entomopathogen, *Lecanicillium lecanii*. Mycopathologia. 172: 161-168.

Hajek AE, St Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.

Hanel HA (1982) Selection of a fungus species, suitable for the biological of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). Z. Angew. Entomol. 94: 237-245.

Kambhampati S, Eggleton P. Taxonomy and phylogeny of termites. In: Abe T, Bignell D; Hiashi, M. (eds.). Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 1-23.

Kang HY, Matsushima N, Sameshima K, Takamura N (1990) Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). Mokuzai Gakkaishi 36: 78-84.

Freyman BP; Buitenwerf R, Souza OG, Olf H (2008) The importance of termites (Isoptera) for the recycling of herbivore dung in tropical ecosystems: a review. Eur. J. Entomol. 105: 165-173.

Lopes RS, Svedese VM, Portela, APAS, Albuquerque AC, Luna-Alves Lima EA (2011) Virulence and biological aspects of *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones in *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). Arq. Inst. Biol. 78: 565-572.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'Ana AEG (2005) A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast. Brazil. J. Ethnopharmacol. 97: 199-206.

Marques RP, Monteiro AC, Pereira GT (2004) Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). Cienc. Rural. 34: 1675-1689.

Meikle WG, Mercadier G, Rosengaus RB, Kirk AA, Derouané F, Quimby PC (2005) Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Deuteromycota: Hyphomycetes) obtained from formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Appl. Entomol. 126: 315-322.

Melo-Santos MAV, Araújo AP, Rios EMM, Regis L (2009) Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. Biol. Control. 49: 186-191.

Mello MO, Silva-Filho MC (2002) Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. Brazil. J. Plant. Physiol. 14: 71-81.

Milano SE, Fontes LR (2002) Termite pests and their control in urban Brazil. Sociobiology.40: 163–177.

Milner RJ, Staples JA, Lutton GG (1997) The effect of humidity on germination and infection of termites by Hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 69: 64-69.

Napoleão TH, Gomes FS, Lima TA; Santos NDL, Sá RA, Albuquerque AC, Coelho LCBB, Paiva PMG (2011) Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. Int. Biodeter. Biodegr. 65: 52-59.

Ohmura W, Doi S, Aoyama M (2000) Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. J. Wood. Sci. 46: 149–153.

Oliveira RLC, Lins-Neto EMF, Araújo EL, Albuquerque UP (2007) Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of Caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). Environ. Monit. Assess. 132: 189-206.

Omena MC, Navarro DMAF, Paula JE, Luna JS, Lima MRF, Santana AEG (2007) Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. Bioresour. Technol. 98: 2549-2556.

Paiva PMG, Santana GMS, Souza IFAC, Albuquerque LP, Agraneto AC; Albuquerque AC, Luz LA, Napoleão TH, Coelho LCBB (2011) Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. Int. Biodeter. Biodegr. 65: 982-989.

Pizarro APB, Filho AMO, Parente JP, Melo MTV, Santos CE, Lima PR (1999) O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32: 23-29.

Rath AC (2000) The use of entomopathogenic fungi for control of termites. Biol Sci. Technol. 10: 563-581.

Sá RA, Napoleão TH, Santos ND, Gomes FS, Albuquerque AC, Xavier HS, Luana CBB, Coelho LCBB, Bieber LW, Paiva PMG (2008) Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. Int. Biodeter. Biodegr. 62: 460-464.

Santana ALBD, Maranhão CA, Santos JC, Cunha FM, Conceição GM, Bieber LW, Nascimento MS (2010) Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. Int. Biodeter. Biodegr. 64: 7-12.

Santos JDG, Espeleta AF; Branco A, Assis SA (2013) Aqueous extraction of pectin from sisal waste. Carbohydr. Polymer. 92: 1997-2001.

Sas Institute. 1999-2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Scheffrahn RH (1991) Allelochemical resistance of wood to termites. Sociobiology. 19: 257-282.

Scheffrahn RH, Cabrera BJ, Kern Jr WH, Su NY (2002) *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. Fla. Entomol. Soc. 85: 273-275.

Silva MDC, Sá RA, Napoleão TH, Gomes FS, Santos, NDL, Albuquerque AC, Xavier HS, Paiva PMG, Correia MTS, Coelho LCBB (2009) Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). Int. Biodeter. Biodegr. 63: 334-340.

Souza JD, Silva MBR, Argolo ACC, Napoleão TH, Sá RA, Correia MTS, Paiva PMG, Silva MDC, Coelho LCBB (2011) A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. Int. Biodeter. Biodegr. 65: 696-702.

Torales GJ (2002) Termites as structural pests in Argentina. Sociobiology 40: 191-206.

Vasconcellos A, Bandeira AG (2006) Populational and reproductive status of a polycalic colony of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) in the urban area of João Pessoa, NE Brazil. *Sociobiology*. 47: 165-174.

Verma M, Sharma S, Prasad R (2009) Biological Alternatives for termite control: a review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63: 959-972.

Wright MS, Connick WJ, Jackson MA (2003) Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.

Wright M, Alan L (2013) Combined effect of microbial and chemical control agents on subterranean termites *J. Microbiol.* 51: 578-58.

Yamada A, Inoue T, Wiwatwitaya D, Ohkuma M, Kudo T, Sugimoto A (2006) Nitrogen fixation by termites in tropical forests Thailand. *Ecosystems* 9: 75-83.

Yanagawa A, Yokohari F, Shimizu S (2008) Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 165-170.

7. Apêndice

Tabela 1. Linhagens de *Isaria* utilizadas nos experimentos.

Linhagens	Origem	Hospedeiro	Germinação (%)	CL ₅₀ (IC) ¹ (mg/mL)
<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355	Micoteca/UFRPE	<i>Brassolis sopharea</i>	91	6,66x10 ⁴ (12,47-3,10)
<i>Isaria javanica</i> URM4993	Micoteca/URM	<i>Lonomia obliqua</i>	98	7,22x10 ⁵ (20,25-2,43)
<i>Isaria fumosorosea</i> ESAL1297	Micoteca/UFRPE	<i>Bemisia tabaci</i>	91	4,60x10 ⁵ (13,10-1,38)

¹Intervalo de confiança significativo a 95%.

Tabela 2. Concentração Letal (CL₅₀) dos extratos de *Agave sisalana* sobre *Nasutitermes corniger*.

Operários				Soldados			
		CL ₅₀ (IC) ¹ (mg/mL)	Equação de regressão	(χ^2) ²	CL ₅₀ (IC) (mg/L)	Equação de regressão	(χ^2)
Extrato Aquoso (EAAs)		8,0 (11,00-4,80)	Y=5.15707+1.65228*logX	86,89	9,7(12,00-5,40)	Y=5.0215+1,555233*logX	67,33
Extrato	Hidroetílico	7,7 (11,00-4,50)	Y=5.15707+1.65228*logX	113,91	9,5(11,00-4,50)	Y=5.0325+1,566254*logX	76,44
(EHEAs)							

¹Intervalo de confiança significativo a 95%.

² Calculado pelo Probit

Tabela 3. Efeito dos extratos aquoso e hidroetílico de *Agave sisalana* sobre a germinação (%), crescimento (cm) e esporulação (10^7 conídios/mL) das espécies de *Isaria*.

Aspectos Biológicos das Linhagens										
Extrato (mg/mL)	<i>Isaria farinosa</i> ESALQ1355			<i>Isaria javanica</i> UM4993			<i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ1297			
EAs	G ¹	C ²	E ³	G ¹	C ²	E ³	G ¹	C ²	E ³	
Controle	100,00a	3,85a	4,17a	98,66a	3,20a	2,40a	98,40a	3,54a	2,06a	
10	98,30a	3,53a	3,92a	98,00a	3,01a	1,90a	96,00a	3,47a	1,96a	
25	97,60a	3,45a	2,80b	97,00a	3,00a	1,71a	95,70a	3,05b	1,59b	
50	98,40a	2,91b	2,79b	96,00a	2,71b	0,88b	81,06a	2,81c	1,53b	
100	95,66a	2,93b	2,2bc	96,00a	2,51b	0,86b	74,93a	2,41d	1,04 c	
200	95,67b	2,16c	1,46d	96,00a	2,00c	0,53b	33,60c	2,33d	0,57a	
EHEAs										
Controle	100,00a	3,20a	3,64a	98,66a	3,93a	2,35a	98,66a	3,25a	2,06a	
10	98,93a	2,55b	3,37a	96,55a	3,91a	2,05a	96,55a	3,16a	1,74a	
25	98,66a	2,53b	3,17a	98,13a	3,74a	1,75ab	98,13a	2,83ab	1,51ab	
50	98,13a	2,55b	3,16a	97,87a	3,40b	1,48ab	97,87a	2,81ab	1,24abc	
100	97,86a	1,10c	2,17b	96,53a	3,05c	1,26ab	96,53a	2,50b	1,77bc	
200	97,67a	0,00d	0,00d	96,80a	2,59c	1,15ab	96,80a	1,91b	1,50c	

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

¹ Germinação, ² Crescimento, ³ Esporulação

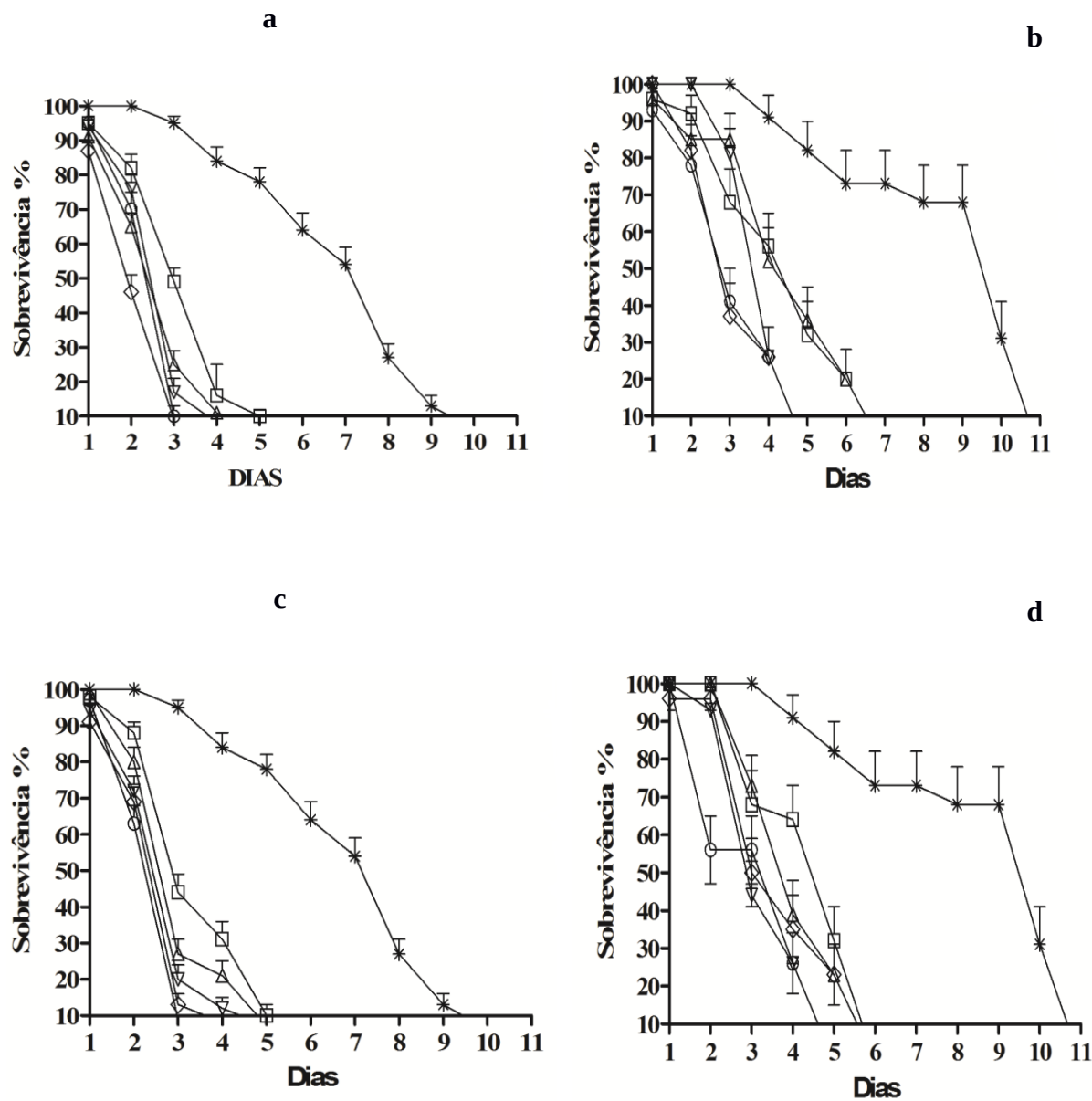


Figura 1. Percentual de sobrevivência de operários e soldados *Nasutitermes corniger* tratados com os extratos salinos de *Agave sisalana*: EAs sobre operários (a) e soldados (b). EHEAs sobre operários (c) e soldados (d), nas concentrações 10 ($\square$), 25 ($\triangle$), 50 (∇), 100 ($\diamond$), 200 mg/L ($\ominus$) e o controle ($\ast$). Cada ponto é apresentado como média $\pm$ SE das cinco repetições.

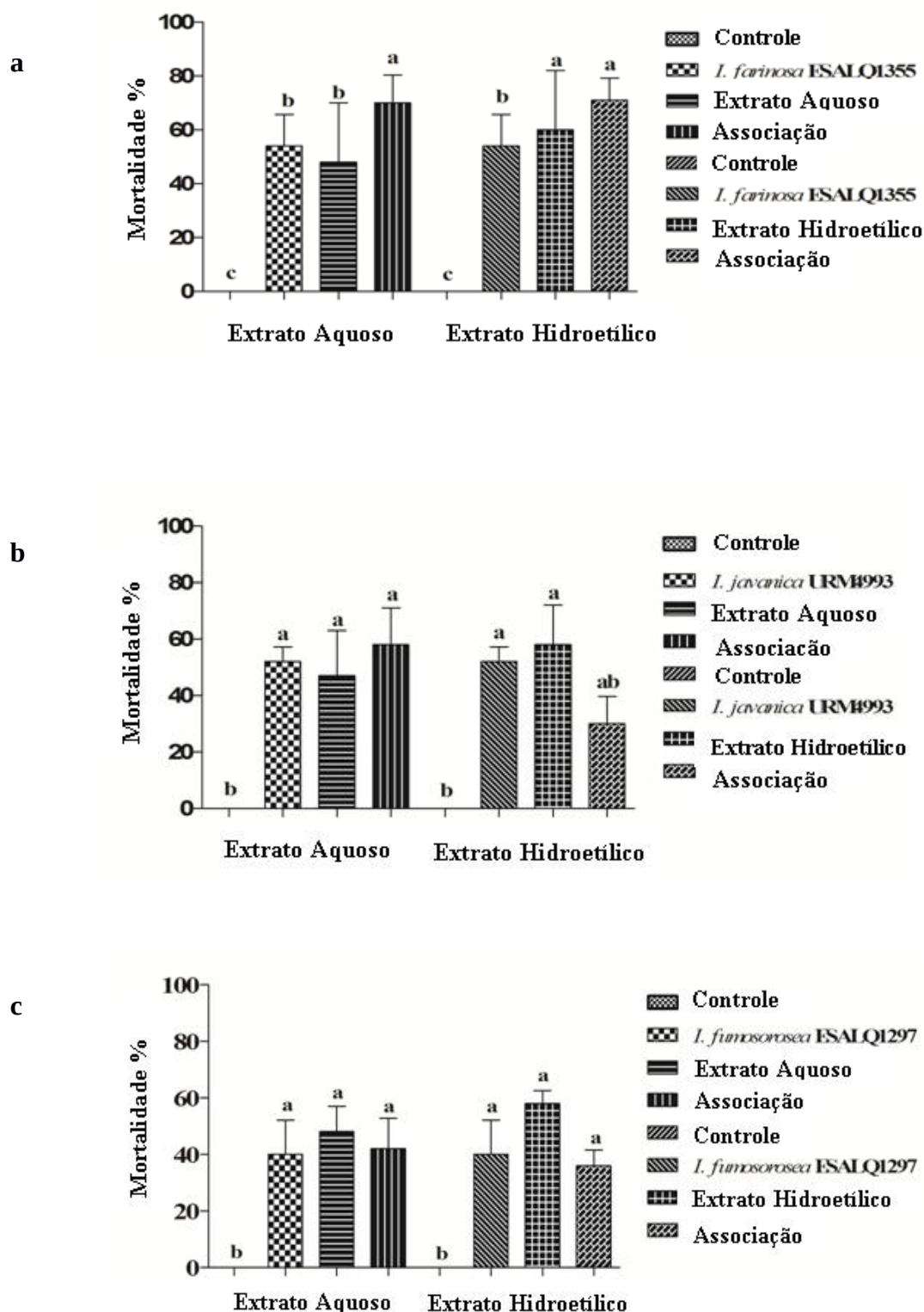


Figura 2. Efeito da associação das linhagens fúngicas com os extratos aquoso e hidroetílico de *Agave sisalana* sobre os operários de *Nasutitermes corniger*: *Isaria farinosa* ESALQ1355 (a), *Isaria javanica* URM4993 (b) e *Isaria fumosorosea* ESALQ1297 (c). Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÃO

As linhagens de *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* não foram patogênicas às ninfas e fêmeas adultas de *D. opuntiae*;

As linhagens de *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* foram patogênicas aos operários e soldados de *N. corniger*, sendo *I. farinosa* ESALQ1355 a mais eficaz no controle do cupim.

Os extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* apresentaram potencial inseticida sobre *N. corniger* e *D. opuntiae*.

Os inseticidas Clorpirifós, Acetamiprid, Thiamethoxan e Lambacyhalothrin causaram a mortalidade de *D. opuntiae* nas concentrações testadas, sendo o inseticida Clorpirifós o mais eficaz sobre ninfas e fêmeas adultas da cochonilha;

Os inseticidas Acetamiprid, Thiamethoxan e os extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* foram compatíveis com as linhagens fúngicas.

A associação dos extratos de *L. ferrea* var. *ferrea* e *A. sisalana* com inseticidas químicos foi positiva para o controle de *D. opuntiae* e a associação com o inseticida Clorpirifós foi a mais eficiente sobre as ninfas e fêmeas adultas do inseto.

A associação entre os extratos e as três linhagens de *Isaria* mais eficientes demonstrou que *I. farinosa* ESALQ1355 foi a mais efetiva no controle dos operários de *N. corniger*.

7. ANEXO

7.1 Guia para os Autores



BIOLOGICAL CONTROL

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1049-9644

DESCRIPTION

Biological control is an environmentally sound and effective means of reducing or mitigating **pests** and pest effects through the use of natural enemies. The aim of *Biological Control* is to promote this science and technology through publication of original research articles and reviews of research and theory. The journal devotes a section to reports on biotechnologies dealing with the elucidation and use of genes or gene products for the enhancement of **biological control agents**. The journal encompasses biological control of **viral, microbial, nematode, insect, mite, weed,** and **vertebrate** pests in agriculture, aquatic, forest, natural resource, stored product, and urban environments. Biological control of arthropod pests of human and domestic animals is also included. Ecological, molecular, and biotechnological approaches to the understanding of biological control are

welcome. This multidisciplinary journal covers:

- Entomology-parasitoids, predators, and pathogens and their use through importation, augmentation, and/or habitat management strategies
- Plant Pathology-antagonism, competition, cross-protection, hyperparasitism, hypovirulence, and soil suppressiveness through naturally occurring and introduced agents
- Nematology-predators, parasitoids, and pathogens in biological control through augmentation and/ or habitat management strategies and suppressive soils through naturally occurring and introduced agents
- Weed Science-vertebrates, invertebrates, and pathogens and their use through classical, augmentative, or bioherbicidal tactics

The following sections are included:

- Molecular Technology-advances in the understanding of biological control agents and their mechanisms
- Forum-theoretical and special topics Letters to the [Editors](#)-serving as an avenue for debate.

AUDIENCE

Pest control scientists, ecologists, agricultural scientists, entomologists

IMPACT FACTOR

2013: 1.873 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors:

J. Brodeur, Institut de recherche en biologie végétale, Montréal, QC, Canada

J. Cory, Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada

J.D. Harwood, University of Kentucky, Lexington, KY, USA

J.H. Hoffmann, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa

B. Jacobsen, Montana State University, Bozeman, MT, USA

E.E. Lewis, University of California at Davis, Davis, CA, USA

P. Ode, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

D.O. TeBeest, University of Arkansas, Fayetteville, AR, USA

S.B. Vinson, Texas A&M University, College Station, TX, USA

Editorial Board:

M. Aluja, Instituto de Ecología, AC, Xalapa, Veracruz, Mexico

B. Blossey, Cornell University, Ithaca, NY, USA

G. Boivin, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada

W.L. Bruckart III, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Fort Detrick, MD, USA

C.T. Bull, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Salinas, CA, USA

R.R. Bélanger, Université Laval, Quebec, QC, Canada

D. Chandler, University of Warwick, Warwick, UK

R. Charudattan, University of Florida, Gainesville, FL, USA

M. Coll, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

E. Conti, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

K.M. Daane, University of California at Berkeley, Berkeley, CA, USA

C.M. Dolinski, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Brazil

J. Eilenberg, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

J.H. Frank, University of Florida, Gainesville, FL, USA

M.S. Goettel, Lethbridge, AB, Canada

C.T. Griffin, National University of Ireland, Maynooth, Maynooth, Co. Kildare, Ireland

G. Gurr, Charles Sturt University, Orange, NSW, Australia

I.C.W. Hardy, University of Nottingham, Loughborough, England, UK

M.A. Hoy, University of Florida, Gainesville, FL, USA

R. Hufbauer, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

M.S. Hunter, University of California at Riverside, Riverside, CA, USA

M.W. Johnson, University of California at Riverside, Riverside, CA, USA

J. Jurat-Fuentes, University of Tennessee, Knoxville, TN, USA

H.K. Kaya, University of California at Davis, Davis, CA, USA

M. Keller, University of Adelaide, Adelaide, SA, Australia

N. Kokalis-Burelle, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Weslaco, TX, USA

A. Koppenhöfer, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA

P.J. Krell, University of Guelph, Guelph, Canada

D.A. Landis, Michigan State University, East Lansing, MI, USA

J.-H. Lee, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea

E.E. Lewis, University of California at Davis, Davis, CA, USA

S.E. Lindow, University of California at Berkeley, Berkeley, CA, USA

T.-X. Liu, Northwest A and F University, Yangling, Shaanxi, China

W. Mahaffee, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Corvallis, OR, USA

A. McClay, McClay Ecoscience, Sherwood Park, AB, Canada

R. Messing, Kauai Agricultural Research Center, Kapa'a, HI, USA

J.P. Michaud, Kansas State University, Hays, KS, USA

N.J. Mills, University of California at Berkeley, Berkeley, CA, USA

H. Norambuena, INIA Carillanca, Temuco, Chile

AUTHOR INFORMATION PACK 9 Jul 2013 www.elsevier.com/locate/ybcon 3

M. O'Callaghan, AgeResearch Ltd., Lincoln, New Zealand

R.D. Possee, NERC Inst. of Virology, Envir.Microb, Oxford, UK

W. Powell, IACR-Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Hertfordshire, England, UK

J.M. Raaijmakers, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands

S. Raghu, University of Arkansas, Stuttgart, AR, USA

D.P. Roberts, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Beltsville, MD, USA

G.K. Roderick, University of California at Berkeley, Berkeley, CA, USA

J.A. Rosenheim, University of California at Davis, Davis, CA, USA

E.N. Rosskopf, USD ARS USHRL, Fort Pierce, FL, USA

J.R. Ruberson, University of Georgia, Athens, GA, USA

D.I. Shapiro-Ilan, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Byron, GA, USA

A. Sheppard, CSIRO (The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), Canberra, ACT, Australia

W.E. Snyder, Washington State University, Pullman, WA, USA

R. Stouthamer, University of California at Riverside, Riverside, CA, USA

J. Vandenberg, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Ithaca, NY, USA

S.P. Wraight, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Ithaca, NY, USA

F. Wäckers, Lancaster University, Lancaster, UK

G.Y. Yuen, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, NE, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Biological Control promotes the science and technology of biological control through publication of original research articles and reviews of research and theory. The focus includes new and emerging trends in this field. Biological control is defined as the reduction or mitigation of pests and pest effects through the use of natural enemies. Biotechnologies dealing with the elucidation and use of genes or gene products for the enhancement of biological control agents are also of interest.

The journal encompasses biological control of viral, microbial, nematode, insect, mite, weed, and other invertebrate and vertebrate pests in agricultural, aquatic, forest, natural resource, stored products, and urban environments. Biological control of arthropod pests of human and domestic animals is also included. Ecological, behavioral, molecular, and biotechnological approaches to advancing the understanding of biological control agents are welcome.

Types of paper

The following types of original papers only will be considered.

Regular research papers are hypothesis-driven projects in biological control as defined above under the "Subject areas of the journal". These papers constitute the majority of the articles published in the journal. However, papers which report on routine results of host specificity studies on new biological control agents, surveys for known or unknown biological control agents, or screening of natural enemies against a pest species will not be considered for publication unless the account describes unusual circumstances or novel methods, or unless the study is placed in a broader perspective. Research papers should have the following sections: a brief Abstract that contains a concise statement of the results obtained; Keywords listed immediately after the Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgments; and References. Further details are provided below under "Preparation of manuscript".

Perspectives papers provide the authors with a forum for discussing topics and trends in biological control. These articles should raise interesting or unanswered questions, present arguments about the significance of recent findings, describe the application and limitations of

new methods and technologies, or consider potential interfaces between biological control and other disciplines in the sciences. These manuscripts should include the format as listed for the **Regular research papers** or may deviate by having the following sections: Abstract, Introduction, appropriate headings, Conclusion, and References.

Review articles are intended to reach a broad audience of readers from investigators in the field to new graduate students learning the material for the first time. Review articles are subject to the same review process as original papers. Manuscripts should be prepared according to the general guidelines given below. The Materials and Methods, Results, and Discussion sections may be replaced with appropriate alternatives; an Abstract is still required. The editors invite inquiries and suggestions for timely and provocative review articles. In some cases, there may be a number of review articles (e.g., a symposium topic) in which case a special issue of the journal may be published. The special issue may include an invited "editor(s)" who invites the authors and selects the topics, provides the guidelines to the authors, sets deadlines, etc., and submits the manuscripts to the journal. The journal editor then handles the manuscripts following normal protocols.

Biological Control does not publish Short Communications or Research Notes.

Contact details for submission

Manuscripts should be written in grammatically correct English and should be submitted through the Web site at <http://ees.elsevier.com/bcon>.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

Ethics. Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it

will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder. Written authorization may be required at the discretion of the editors. Articles and any other material published in *Biological Control* represent the opinions of the authors and should not be construed to reflect the opinions of the editors or the publisher. A submitted paper will be considered in violation of Elsevier's Ethics Guidelines, and thus potentially subject to rejection or retraction, in the event of the following: the study results are inaccurately or deceptively reported, the data from the study results cannot be produced, the paper submitted is not an original work or it has plagiarized (by copying or paraphrasing) another work, the paper has been submitted concurrently to another journal or is elsewhere published, other works discussed in the paper are improperly cited or un-cited, the list of co-authors is incomplete or contains those who have not contributed substantially to the work, any experiments involving human or animal subjects or hazardous chemicals are not ensured in the paper as having been conducted according to the appropriate guidelines, or financial or otherwise conflicts of interest are not disclosed. For a comprehensive explanation of Elsevier's Ethics Guidelines, please visit

<http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. Should questions of probity arise under extraordinary and controversial situations, the editors will reserve the right to subject the authors' data to independent scientific evaluation. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a Journal Publishing Agreement. (for

more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or

distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription. *For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for

all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing

their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Consult the latest edition of the CBE Style Manual, Council of Biology Editors, Inc., for standard abbreviations, names, and symbols for units, as well as for informative suggestions about grammar, style, and usage. Nonstandard abbreviations should be minimal and should be defined at first mention. Follow the latest edition of "Webster's New International Dictionary" for spelling and division of words. Use numerals with standard units of measurement and for any number above nine. For the sake of consistency, the journal will use U.S. English. Manuscripts should be typed with the language set to U.S. English.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information. For organisms, the complete taxonomic name including the authority must be given at first mention in the text. For exceptions to this rule, such as names of bacteria, consult the editor. The names of insects will be in accordance with the Entomological Society of America. Wherever a common name for a pesticide exists, it should be used. The chemical name of the pesticide must be included in parentheses following the first mention of the common name. Most common names may be found in Guide to the Chemicals Used in Crop Protection by E.Y. Spencer, Agriculture Canada, 7th ed., 1982, and more recent entries are found in The Pesticide Manual-A World Compendium (C.R. Worthington, Ed.; S.B. Walker, Asst. Ed.), 8th ed., British Crop Protection Council, Binfield, Bracknell, Berks RG 125QE, England. In addition, common names of insecticides are listed from time to time by the Entomological Society of America; of herbicides, by the Weed Science Society of America; and of fungicides, by the American Phytopathological Society. For weed names, use the terminology approved by the Weed Science Society of America [Weed Science 32 (Suppl. 2), 1-137, 1984]. For enzymes,

the systematic name and number given by the Enzyme Commission (EC) should be included at the first point of mention for each enzyme of importance in the paper. For EC numbers, consult Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking>

for more information and a full list of supported databases. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management

packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to:

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; NLM Catalog (Journals referenced in the NCBI Databases):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>;

CAS (Chemical Abstracts Service): via <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or

higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections

quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as

accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections

cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via

<http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>



SCIENTIA HORTICULTURAE

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0304-4238

DESCRIPTION

Scientia Horticulturae is an international journal publishing research related to **horticultural crops**. Articles in the journal deal with open or protected production of **vegetables, fruits, edible fungi** and **ornamentals** under temperate, subtropical and tropical conditions. Papers in related areas (biochemistry, micropropagation, soil science, plant breeding, plant physiology, phytopathology, etc.) are considered, if they contain information of direct significance to **horticulture**. Papers on the technical aspects of horticulture (engineering, crop processing, storage, transport etc.) are accepted for publication only if they relate directly to the living product. In the case of plantation crops, those yielding a product that may be used fresh (e.g. tropical vegetables, citrus, bananas, and other fruits) will be considered, while those papers describing the processing of the product (e.g. rubber, tobacco, and quinine) will not. The scope of the journal includes all horticultural crops but does not include speciality crops such as, medicinal crops or forestry crops, such as bamboo.

Types of paper:

1. Original full papers (regular papers)
2. Review articles (should cover a part of the subject of active current interest)
3. Short Communications
 - 3.1 Report of preliminary results of important research (pilot investigation: e.g. no duplications or with other restrictions)
 - 3.2 Newly developed methodology or modification of existing methodology, possibly description of first test.
 - 3.3 Results of the application of an earlier published research methodology on other crops or under different conditions (fact finding or recipes) that are nevertheless of interest to an international readership. Should include new scientific insight.
4. Book Reviews (included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old).

Original papers should report the results of original research and should be of international and not only regional interest. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Reviews should cover a part of the subject active current interest. They may be submitted or invited.

Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They

should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, etc.).

For consultation or suggestions please contact the [Editors-in-Chief](#).

AUDIENCE

Horticulturists, Plant Breeders, Plant Physiologists.

IMPACT FACTOR

2013: 1.504 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

CAB Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBiology

Ecological Abstracts

Elsevier BIOBASE

GEOBASE

PASCAL/CNRS

Research Alert

SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

J.P. Bower, Mission, BC, Canada

Samir C. Debnath, St. John's, Newfoundland and Labrador, Canada

X.X. Deng, HuaZhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

T. Moriguchi, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, Japan

D. Schwarz, Leibniz-Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Grossbeeren, Germany

Founding Editor

S.J. Wellensiek,

Editorial Board Members

G.H. Barry, XLnT Citrus Company, Helderberg, Cape Town, South Africa

R.I. Cabrera, Texas A&M University, Dallas, TX, USA

G. Colla, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, Italy

C. de Kreijl, Research Floriculture & Glasshouse Vegetables, Hoofddorp, Netherlands

M. Dorais, Université Laval, Québec, Canada

G.C. Douglas, Teagasc Agriculture and Food Development Authority, Dublin 19, Ireland

R.L. Geneve, University of Kentucky, Lexington, KY, USA

A. Gunes, Ankara University, Ankara, Turkey

W. Guo, HuaZhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

W.P. Hackett, University of California at Davis, Davis, CA, USA

V. Kesavan, Department of Agriculture Western Australia, Carnarvon, WA, Australia

C. Lovatt, University of California at Riverside, Riverside, CA, USA

A. Monteiro, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa Cedex, Portugal

P. Mooney, Sardi, Urrbrae, Adelaide, SA, Australia

R.E. Paull, University of Hawaii at Mānoa, Honolulu, HI, USA

F. Pliego Alfaro, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

J.V. Possingham, Possum's Vineyard, Unley Park, SA, Australia

L. Rallo, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

M.S. Reid, University of California at Davis, Davis, CA, USA

D. Savvas, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

R.R. Sharma, IARI, New Delhi, India

D.W. Turner, University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia

X. Wang, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2013 www.elsevier.com/locate/scihorti 3

G.E. Welbaum, Virginia Tech University, Blacksburg, VA, USA

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2013 www.elsevier.com/locate/scihorti 4

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original full papers (Regular Papers)
2. Review articles should cover a part of the subject of active current interest.
3. Short Communications
 - 3.1 Report of preliminary results of important research (pilot investigation; e.g. no duplications or with other restrictions).
 - 3.2 Newly developed methodology or modification of existing methodology, possibly description of first test.
 - 3.3 Results of the application of an earlier published research methodology on other crops or under different conditions (fact finding or recipes) that are nevertheless of interest to an international readership.
4. Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Original papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Reviews should cover a part of the subject active current interest. They may be submitted or invited.

Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, etc.).

For consultation or suggestions please contact the Editors-in-Chief.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Authorship of the paper (ICMJE)

Authorship should be limited to those who have made a significant contribution to the conception, design, execution, and interpretation of the reported study. All those who have made significant contributions should be listed as co-authors. Where there are others who have participated in certain substantive aspects of the research project, they should be acknowledged or listed as contributors. The corresponding author should ensure that all appropriate co-authors and no inappropriate coauthors are included on the paper, and that all co-authors have seen and approved the final version of the paper and have agreed to its submission for publication.

For more information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See

also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author

of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted

reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see

<http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2013 www.elsevier.com/locate/scihorti 6

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do

not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to

eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/horti/>

Referees

Suggesting 5 reviewers is required for submission. Please note that only one suggested reviewer can be from your own country, and suggest four potential reviewers from different countries including full contact details and e-mail addresses. Note that the Editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Results and Discussion should be two separate sections.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear. Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter

O, and between one (1) and the letter l. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a

horizontal line. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., 18O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter. *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book

chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.

(2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci.

Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly

relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and

examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately -please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>).

Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via

<http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>



INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION

The Official Journal of the [International Biodeterioration and Biodegradation Society](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0964-8305

DESCRIPTION

International Biodeterioration and Biodegradation publishes original research papers and reviews on the **biological causes of deterioration or degradation**.

– The causes may be macro- or microbiological, whose origins may be aerial, aquatic, or terrestrial.

– The effects may include corrosion, fouling, rotting, decay, infection, disfigurement, toxification, weakening or processes that liquefy, detoxify, or mineralize.

– The materials affected may include natural, synthetic or refined materials [such as metals, hydrocarbons and oils, foodstuffs and beverages, pharmaceuticals, cellulose and wood, plastics and polymers, fibres, paper, leather, waste materials or any other material of commercial importance]; and structures or systems [such as buildings, works of art, processing equipment, etc.] as well as hazardous wastes, and includes environmental and occupational health aspects resulting from the

activities of the biological agents described above. Papers on all aspects of cause, mode of action, treatment, protection and prevention, analysis and testing, detoxification, upgrading, commercial implications, biocides and substitutes and related areas are welcome. However, papers that are strictly related to engineering aspects of biotechnological processes and those that aim at developing or assessing mathematical-based predictive models used in the designing of biotechnological processes are excluded. *International Biodeterioration and Biodegradation* is the Official Journal of the International Biodeterioration and Biodegradation Society. For more information visit the [International Biodeterioration and Biodegradation Society](#) website.

AUDIENCE

Materials scientists, applied and industrial microbiologists, microbiologists, food scientists.

IMPACT FACTOR

2013: 2.235 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA

Art & Archaeology Technical Abstracts
Biodeterioration Abstracts
Biology and Environmental Sciences
Biotechnology Research Abstracts
Cambridge Scientific Abstracts
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
EMBASE
Elsevier BIOBASE
Environmental Periodicals Bibliography
Forest Products Abstracts
MEDLINE®
Marine Biotechnology Abstracts
Metals Abstracts
Microbiology Abstracts
Nutrition Abstracts
Paper & Board Abstracts
SCISEARCH
Scopus
World Textile Abstracts

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

R.J. Koestler, Smithsonian Institution, Suitland, MD, USA

Editorial Assistant

V. Koestler, , Email: eicibb@hotmail.com

Editors

R. Boopathy, Nicholls State University, Thibodaux, LA, USA, Email: Ramaraj.Boopathy@nicholls.edu

C. Gaylarde, University of Portsmouth, Portsmouth, UK, Email: cgaylarde@googlemail.com

P.A. Geis, Geis Microbial Quality, The Villages, FL, USA, Email: philageis@aol.com

J-D. Gu, The University of Hong Kong, Sar, Hong Kong, Email: jdgu@hkucc.hku.hk

F.J. Passman, Princeton, NJ, USA, Email: fredp@biodeterioration-control.com

R. Schneider, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil, Email: schneide@icb.usp.br

M. Sylvestre, INRS-Institut Armand-Frappier, Québec, QC, Canada, Email: michel.sylvestre@iaf.inrs.ca

C. Urzi, Università degli Studi di Messina, Messina, Italy, Email: clara.urzi@unime.it

Editorial Board

D. Allsopp, Westbrook, Northampton, UK, Email: dennis.allsopp@yahoo.com

R.A. Blanchette, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA, Email: robertb@puccini.crl.umn.edu

J.A. Bumpus, University of Northern Iowa, Cedar Falls, IA, USA, Email: john.bumpus@uni.edu

J.K.H. Cheung, The University of Hong Kong, Hong Kong, Hong Kong, Email: cheungj@hkucc.hku.hk

B. Crook, Health and Safety Laboratory, Sheffield, UK, Email: brian.crook@hsl.gov.uk

M.H. Czechowski, Doylestown, USA, Email: melvin.czechowski@churchdwight.com

K. Demnerova, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic, Email: demnerok@vscht.cz

S.P. Denyer, Cardiff University, Cardiff, UK, Email: denyersp@Cardiff.ac.uk

P. DePriest, Smithsonian Institution, Suitland, MD, USA, Email: depriestp@si.edu

H.-C. Flemming, Universität Duisburg-Essen, Mülheim an der Ruhr, Germany, Email:

HansCurtFlemming@compuserve.com

Y. Hong, Chinese Academy of Sciences (CAS), Guangzhou, China, Email: hongyiguo0708@yahoo.com.cn

G. Howard, Southeastern Louisiana University, Hammond, LA, USA, Email: goward@selu.edu

Y. Jin, Purdue University, West Lafayette, IN, USA, Email: ymjin@purdue.edu

F. Laborda, Universidad de Alcalá, Alcala De Henares, Spain, Email: fernando.laborda@uah.es

R. Margesin, Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Hötting, Austria, Email: rosa.margesin@uibk.ac.at

E. May, University of Portsmouth, Portsmouth, UK, Email: eric.may@port.ac.uk

I. McIntyre, Monash University, Southbank, VIC, Australia, Email: ian@vifp.monash.edu.au

C.J. McNamara, Ocean Spray Cranberries, Inc., Lakeville-Middleboro, MA, USA, Email:

cmcnamara@oceanspray.com

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Oct 2013 www.elsevier.com/locate/ibiod 3

J.A. Micales, U.S. Department of Agriculture (USDA), Forest Service, Madison, WI, USA, Email:

jessieglaeser@yahoo.com

D.A. Moreno, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain, Email: diego.moreno@upm.es

L.H.G. Morton, University of Central Lancashire, Preston, Lancashire, UK, Email: lhgmorton@uclan.ac.uk

A.H. Neilson, Stockholm, Sweden, Email: alasdair.neilson@ivl.se

V.R. Parshad, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India, Email: vrparshad@rediffmail.com

F. Pohleven, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, **Email:** franc.pohleven@bf.uni-lj.si
D.E. Rawlings, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa, **Email:** der@akad.sun.ac.za
D. Roberts, University of Houston, Houston, TX, USA, **Email:** djroberts@uh.edu
W. Sand, Universität Duisburg-Essen, Essen, Germany, **Email:** wolfgang.sand@uni-due.de
K.J. Seal, Thor Specialities (UK) Ltd, Wincham, Northwich, UK, **Email:** kens@thor.uk.com
K.T. Smith, U.S. Department of Agriculture (USDA), Forest Service, Durham, NH, USA, **Email:** kts@hopper.unh.edu
M. Sondossi, Weber State University, Ogden, UT, USA, **Email:** msondossi@weber.edu
J. Verran, Manchester Metropolitan University, Manchester, UK, **Email:** j.verran@mmu.ac.uk
J. Walker, CAMR Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK, **Email:** jimmy.walker@camr.org.uk
T. Warscheid, LBW-Bioconsult, Wiefelstede, Germany, **Email:** lbw.bb@gmx.de
K.A. Whitehead, Manchester Metropolitan University, Manchester, UK, **Email:** k.a.whitehead@mmu.ac.uk
H.-Q. Yu, University of Science & Technology of China, Anhui, China, **Email:** hqyu@ustc.edu.cn
R. Zhang, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Province, China, **Email:** rfzhang@njau.edu.cn
M. Zinn, EMPA, St. Gallen, Switzerland, **Email:** Manfred.Zinn@hevs.ch
K. Sterflinger, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Vienna, Austria, **Email:** katja.sterflinger@boku.ac.at

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

INTRODUCTION

International Biodeterioration & Biodegradation publishes original research papers and reviews on the biological causes of deterioration or degradation.

- The causes may be macro- or microbiological, whose origins may be aerial, aquatic, or terrestrial.

- The effects may include corrosion, fouling, rotting, decay, infection, disfigurement, toxification, weakening or processes that liquefy, detoxify, or mineralize.

- The materials affected may include natural, synthetic or refined materials [such as metals, hydrocarbons and oils, foodstuffs and beverages, pharmaceuticals, cellulose and wood, plastics and polymers, fibres, paper, leather, waste materials or any other material of commercial importance]; and structures or systems [such as buildings, works of art, processing equipment, etc.] as well as

hazardous wastes, and includes environmental and occupational health aspects resulting from the of the biological agents described above. Papers on all aspects of cause, mode of action, treatment, protection and prevention, analysis and

testing, detoxification, upgrading, commercial implications, biocides and substitutes and related areas are welcome. However, papers that are strictly related to engineering aspects of biotechnological processes and those that aim at developing or assessing mathematical-based predictive models used in the designing of biotechnological processes are excluded.

International Biodeterioration & Biodegradation is the Official Journal of the International Biodeterioration and Biodegradation Society.

Types of paper

Contributions may be original papers, review articles, case studies, short communications, reports of conferences or meetings, book reviews, or news of forthcoming meetings. The subject and content of review articles should be discussed with the Editors prior to submission to the journal. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty, and uniqueness will not be accepted for publication. In general, the manuscript should not exceed 10 000 words, or about 20 printed pages.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years

of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see

<http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:
AUTHOR INFORMATION PACK 14 Oct 2013 www.elsevier.com/locate/ibiod 6

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop

<http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for

further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. The online submission system for *International Biodeterioration and Biodegradation* can be accessed at <http://ees.elsevier.com/ibb>.

PREPARATION

The manuscript should be prepared on a word-processor, in single-spaced typing on pages of uniform size with a 2.5cm margin all round. Artificial (hyphenated) word breaks should not be used at the end of lines. Footnotes to the text should be avoided. All pages should be numbered consecutively. To facilitate the review process continuous line numbers should be inserted in the text of the manuscript.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This section should interpret and discuss the results in the light of previous work; it should not repeat at length material presented in the Introduction or Results. In Short Communications, the Results and Discussion sections may be combined.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual

work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should consist of about 150-200 words.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Abbreviations of chemical or other names should be defined when first mentioned, unless the abbreviation is commonly used and internationally known and accepted, e.g. ATP, DNA, EDTA, GCMS, GLC, HPLC, IU (International Unit). For approximately, use approx. or c. (not ca.); for versus, use vs (not v.); for the statistical terms standard deviation, standard error and standard error of the mean, use SD, SE, and SEM without definition.

Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used. Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in scientific abbreviations such as h (not h.), m (not m.), and ppm (not p.p.m.); '%' should be used in preference to 'per cent'; 'per', as in mg per liter, should be written in exponential notation as mg l⁻¹ (not mg/l). Where abbreviations are likely to cause ambiguity or cannot be readily understood by an international readership, units should be given in full. Greek symbols and unusual symbols used for the first time should be defined by name in the left-hand margin.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Authors should check all chemical, biochemical, and microbiological names before submission of the manuscript. Chemical Abstracts should be consulted for names of chemical compounds; The Merck Index, 13th ed., 2001, is a useful alternative source. For biochemicals, the Compendium of Biochemical Nomenclature and Related Documents, published for The Biochemical Society, London, by Portland Press (1992), should be consulted. Enzymes should be given the (trivial) names in Enzyme Nomenclature (Academic Press, 1992) as recommended by the International Union of Biochemistry and the assigned EC number appended.

Latin binomials should be used for all organisms other than man and farm stock. At first mention in both the Abstract and the main body of the text the full names should be given, as in *Mangifera indica*, and thereafter abbreviated by using only the initial letter of the generic name, as in *M. indica*. Where several genera have the same initial letter (and abbreviation of the generic names might cause confusion), the full generic name should be retained. For common generic names in bacteria, the abbreviations standardly used, e.g. Staph., Ser., and Strep. for *Staphylococcus*, *Serratia*, and *Streptococcus*, should be employed. For the correct spelling of bacterial names, authors should consult Bacterial Nomenclature Up to Date <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> or List of Bacterial

Names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr>. For fungal names, the Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> or Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition (Commonwealth Agricultural Bureaux International, Egham, Surrey, 1995) should be consulted.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx

(e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Conventions

All cultures, strains, or varieties on which the work is based must be deposited in a national culture collection, e.g., ASIB, ATCC, CABI, CBS, DSMZ (for an extensive national listing see: <http://wdcm.nig.ac.jp/hpcc.html>), from which they can be obtained by others. Newly determined nucleotide, protein sequences and microarray data* /or amino acid sequence data must be deposited and a GenBank/EMBL/ DDBJ accession number(s) must be included in the manuscript no later than the revision stage of the review process. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication (online posting) date

of the accepted manuscript. If conclusions in a manuscript are based on the analysis of sequences and a GenBank/EMBL/DDBJ accession number is not provided at the time of the review, authors should provide the sequence data as supplemental material. It is expected that, when previously published sequence accession numbers are cited in a manuscript, the original citations (e.g., journal articles) will be included in the References section when possible or reasonable. Analyses should specify the database, and the date of each analysis should be indicated as, e.g., January 2011. If relevant, the version of the software used should be specified. *Microarray data should be MIAME compliant (for guidelines, see <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to

'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

There should be a list of references in alphabetical order at the end of the paper, following the Harvard system. All references in this list must be cited in the text, and vice versa. The references should be indicated at the appropriate place in the text using surnames and year of publication, as in Canale-Parola (1992), Eaton and Hale (1993), and for three or more authors Bjordal et al. (2000). Where in a series, references should be in ascending order of year, as in (Daniel and Nilsson 1986; Canale-Parola 1992; Eaton and Hale 1993; Björdal et al. 2000). Where two or more papers by the same author(s) are published in the same year they should be cited as Smith (1995a), Smith (1995b), etc. When together in parentheses they should appear as (Smith 1992a,b). Each reference in the list should give names and initials of ALL authors, and the year and the exact title of the paper or book. For journals there should follow the full title, volume number (but not part number), and initial

and final page numbers of the article; for books there should follow the name of the publisher and place of publication. The styles for contributions to edited books and proceedings, reports and online articles are shown below.

Björðal, C.G., Daniel, G., Nilsson, T., 2000. Depth of burial, an important factor in controlling bacterial decay of waterlogged archaeological poles. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45, 15-26.

Eaton, R.A., Hale, M.D.C., 1993. *Wood - decay, pests and protection*. Chapman and Hall, London.

Dillon, H.K., Heinsohn, Miller, J.D., (Eds.), 1996. *Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples*. American Industrial Hygiene Association, Fairfax, VA.

Adan, O.C.G., 1994. On the fungal defacement of interior finishes, PhD thesis, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, The Netherlands.

Canale-Parola, E., 1992. Free-living saccharolytic spirochetes: The genus *Spirochaeta*. In: Balows, A., Truper, M., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., (Eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.), Vol. 4, Springer-Verlag, New York, pp. 3524-3536.

Huang, S.J., Bell, J.P., Knox, J.R., Atwood, H., Bansleben, D., Bitritto, W. Broghard, W., Chapin, T.,

Leong, K.W., Natarjan, K., Nepumuceno, J., Roby, M., Soboslai, J., Shoemaker, N., 1976. Design, synthesis and degradation of polymers susceptible to hydrolysis by proteolytic enzymes. In: Sharpely, J.M., Kaplan, A.M., (Eds.), *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*, Applied Science, London, pp. 731-741.

Daniel, G., Nilsson, T., 1986. Ultrastructural observations on wood-degrading erosion bacteria. IRG/WP/1283. The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

Carey, J., Grant, C., 2002. The treatment of dry rot in historic buildings. Cathedral Communications

Ltd, online at <http://www.buildingconservation.com/articles/rot/rot.htm>.

Unpublished data or private communications should not appear in the reference list.

References to unpublished data will only be accepted at the discretion of the Editors.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at

<http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives

an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article

will be automatically linked as in the following example: [doi:10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is

solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

BioControl

Journal of the International Organization for Biological Control

Editor-in-Chief: Eric Wajnberg

ISSN: 1386-6141 (print version)

ISSN: 1573-8248 (electronic version)

Journal no. 10526

Instructions for Authors

BioControl

Scope

BioControl is the official journal of the International Organization for Biological Control (IOBC). It includes original papers on basic and applied research in all aspects of biological control of invertebrate or vertebrate pests, diseases, and weeds. Subject areas covered in BioControl comprise biology and ecology of organisms for biological control, and various facets of their use including any biological means of control for integrated pest management (IPM) such as plant resistance, pheromones and intercropping. Interdisciplinary papers with a global perspective on the use of biological control in integrated pest management systems are strongly encouraged. Developments in molecular biology and biotechnology that have direct relevance to biological control will also be considered for publication. Organisms covered by BioControl include parasitoids, invertebrate and vertebrate predators of pest animals and plants, mites, plant and insect pathogens, nematodes, and weeds.

Article Types

Original research papers are full length papers describing original research or a novel hypothesis. A concise presentation is encouraged; the paper should not exceed 25 pages of double-spaced typed text (including abstract, tables, figures and references). One doublespaced typed page contains approximately 300-350 words. Forum papers aim to stimulate discussion and debate, particularly by presenting new ideas and by suggesting alternative interpretations to the more formal research papers published in BioControl and elsewhere. Reviews are normally by invitation from the Editor-in-Chief, or by an Associate Editor. However, authors are encouraged to submit a tentative title and a table of contents of a proposed review for consideration. These reviews should not exceed 40 pages of doublespaced typed text (including abstract, tables, figures and references).

Instructions for Authors

Letters to the Editor usually on matters of general concern to biocontrol research, are welcome but should not exceed 4 typed pages. Examples of topics for such letters include solutions to long-standing problems, exposure of significant contradictions, responses to a hypothesis or other letters to the editors published in BioControl. The decision to publish submitted letters resides with the Editor-in-Chief.

Manuscript submission

Language

Manuscripts should be written in clear, concise, and grammatically correct English. British or American English spelling and terminology should be used, but either one should be followed consistently throughout the article. If English is not your native language we strongly urge you to have the text of your paper checked by a native English speaker before submission. Manuscripts that are inadequately prepared will not be considered for publication and will be returned to the authors.

Legal requirements Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors. How to submit Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please connect directly to the site and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. Upon submission, the e mail addresses of all authors will be requested. At the end of the submission

process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work. www.editorialmanager.com/bico

Manuscript preparation

BioControl adheres to a policy of blinded reviewing, in which the identity of the authors is, as much as possible, kept from reviewers. Similarly, reviewers' names are kept confidential. Authors are therefore encouraged to avoid explicit disclosure of their identity in the text of their manuscript, as for example, by use of a header. In some cases the Editor-in-Chief may decide that direct discussion between author(s) and reviewer(s) would be helpful, but names are never disclosed without explicit permission. Blind title page A page giving only the title without the authors' names should be provided for use in the (double blind) review process. Do not include author(s) name(s) in the text or page header.

Abstract

Please provide an abstract of 100 to 150 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. Text Please double-space all material, including notes and references. All pages should be numbered consecutively, and lines should also be numbered within each page. Main text should contain (1) an INTRODUCTION summarizing the background and aims and ending with a very brief statement of what has been achieved by the work; (2) a MATERIAL AND METHODS section containing sufficient detail so that all procedures can be repeated (in conjunction with cited references); (3) a RESULTS section presenting results without extended lines of inference, arguments or speculations; (4) a DISCUSSION section interpreting the results and explaining the importance and relevance of the research. Text formatting

- Use a normal, plain font (e.g., 12 point Times Roman) for text.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use MathType instead. Save your file in two formats: doc and rtf. Do not submit docx files.

Heading levels Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. Alternatively, they can be collected in a separate list following the Keywords.

SI units, numbers

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

Nomenclature

Authors should adhere to the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names including authors (and Order: Family, when appropriate) when the English term is first used in the main text, with the exception of common domestic plants and animals. Please relate to scientific names as follows:

- a) In the TITLE only give the Latin name but NO authority or (Order: Family)
- b) In the ABSTRACT all Latin names should be accompanied with the correct authority and if applicable with (Order: Family)
- c) In addition, at the FIRST MENTION in the body of the text - and only then - these data should be given
- d) The order, family of the most important organisms in the paper (e.g., those referred to in the title), should also go in the KEYWORDS list. Please give full genus and species names again, anywhere in the text where there is likely to be ambiguity.

Footnotes

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

References

The list of References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. References in English available at the international level should be preferred and authors are encouraged to cite references of works published in previous issues of BioControl.

Citation in text

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted (Becker and Seligman 1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

List style

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Smith J, Jones M Jr, Houghton L (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

Always use the standard abbreviation of a journal name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>

Tables

- Tables should appear each on separate sheets after the list of references.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table title. The table title should explain clearly and concisely the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Figures

- Figures should appear each on separate sheets after the list of references, after tables. All captions should be grouped on a separate sheet before figures.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each figure, please supply a figure caption.
- Make sure to identify all elements found in the figure in the caption.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the caption.

For more information about preparing your illustrations, please follow the hyperlink to the artwork instructions on the right.

Authors biography

To be submitted along with the manuscript (in a separate file) and preferably no longer than 100 words. Authors are invited to include a brief Authors Biography, which will appear after the References section. This is not

mandatory. This provides an opportunity to present brief details of the authors and the overall research projects within which the published work has been carried out. The authors biography is not intended to replace standard acknowledgments, but rather to provide readers with an outline of the structure and objectives of the research teams, or groups, responsible for the work. An example of such a box is: This research is part of a PhD project of Kim Surther devoted to the analysis of the host specificity of different *Trichogramma* species against the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. Dr Susan Wardren is studying population genetics (mainly on parasitoid insects). Dr. Ted Fitzmeiter is involved in developing field experiments for testing the efficiency of potential biological control programmes. On particular interest is the analysis of inter-specific variation in insect parasitoids for finding efficient biocontrol agents. This work was carried out in the Ecology of Parasitoids group (lead by Franck Vernont) at INRA, Sophia Antipolis, France.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be submitted in a separate file. The names of funding organizations should be written in full.

Statistics

Correct and accurate statistical methods should be used to analyze data presented in the manuscript, and especially for non-Gaussian traits. Generalized Linear Model (GLM) should always be preferred over data transformation or non-parametric procedures (for counts, percentages & time durations, at least). Standard errors (SE) have always to be indicated in the text, tables and figures (including for simple percentages). If needed, authors are strongly invited to take advice from a Statistician. Correspondingly, manuscripts judged to be based on inadequate or inaccurate statistical methods will be rejected without the possibility of resubmission.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork -photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading. Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size. All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide. Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. **Halftone Art Definition:** Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc. Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication. If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts). Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt). Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number

the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width. For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm. For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Springer web page with questions related to:

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the IOBC (or grant the IOBC exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints/Reprints

Free and/or additional offprints can be ordered by the corresponding author. Seventy-five offprints of each contribution are supplied free of charge to the corresponding author.

Color in print

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Online first

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting errors and the completeness and accuracy

of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the

© Springer faz parte do Springer Science+Business Media

scientific content of your paper and thus smooth the peer review process. The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズ グループ ジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다. Edanz Editing Global__