



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ROBERTA DE FREITAS GRASSE

**Avaliação dos parâmetros biológicos de *Fusarium caatingaense* antes e após
o seu revigoramento e sua patogenicidade à *Praelongorthezia praelonga*
(Hemiptera: Ortheziidae)**

RECIFE

2024

ROBERTA DE FREITAS GRASSE

Avaliação dos parâmetros biológicos de *Fusarium caatingaense* antes e após o seu revigoramento e sua patogenicidade à *Praelongorthezia praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Dra. Athaline Gonçalves Diniz

Coorientador (a): Profa. Dra. Patrícia Vieira Tiago

RECIFE

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Grasse, Roberta de Freitas.

Avaliação dos parâmetros biológicos de *Fusarium caatingaense* antes e após o seu revigoramento e sua patogenicidade à *Praelongorthezia praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae) / Roberta de Freitas Grasse. - Recife, 2024.

55p : il., tab.

Orientador(a): Athaline Gonçalves Diniz

Coorientador(a): Patricia Vieira Tiago

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Controle biológico. 2. Hemiptera. 3. Inseto-praga. 4. Interação patógeno-hospedeiro. 5. Virulência. I. Diniz, Athaline Gonçalves. (Orientação). II. Tiago, Patricia Vieira. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

ROBERTA DE FREITAS GRASSE

Avaliação dos parâmetros biológicos de *Fusarium caatingaense* antes e após o seu revigoramento e sua patogenicidade à *Praelongorthezia praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 26/09/2024

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Athaline Gonçalves Diniz (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Ana Carla Da Silva Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Roger Fagner Ribeiro Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Ma. Julie Erica da Rocha Alves (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico para todas as mulheres que antes de mim lutaram para que hoje eu pudesse
concluir essa graduação. Em especial, dedico aos meus pais.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Elisabeth e ao meu pai Idalmir, que por toda a vida lutaram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, apoiaram meus sonhos e cuidaram tão bem de mim. Eu nunca terei palavras suficientes para agradecer por tanto e nem expressar o quanto eu amo vocês. E pai, muito obrigada por acima de tudo ter escolhido ser meu pai.

As minhas amigas, Isadora e Vitória, que por mais de uma década estão do meu lado, me acompanhando nessa jornada insana que é a trajetória da vida humana na terra. Obrigada por sempre apoiarem meus sonhos. Um agradecimento adicional à Vitoria, que foi a peça chave para que eu escolhesse a UFPE como minha casa.

A Marcela e Gabrielly que estão a tanto tempo na minha vida que eu nem sei como era sem vocês, obrigada por me acolherem aqui, por serem tão amigas.

A Giovana, minha querida amiga, muito obrigada pelo seu apoio e amizade por tanto tempo. Crescer com você e com toda a sua família com certeza fez a diferença em quem eu sou hoje.

A Julia e Kallyne, as primeiras amigas que a UFPE me concedeu. Obrigada por me acompanharem nessa jornada que foi a nossa graduação e é a nossa vida. Com certeza, não teria tido a mesma graça sem vocês.

Ao Pedro, cujo coração enorme não se cansa de fazer tanto por mim. Eu sempre serei grata a você, por todo amor, cuidado, zelo, carinho, incentivo e apoio que tem me dado desde que apareceu na minha vida. Amo você, obrigada por tanto todos os dias.

A prof.^a Patricia, cuja aula no primeiro semestre do curso foi tão boa, tão cativante que desde então eu me apaixono mais pela micologia. Obrigada pela oportunidade, por ter me acolhido desde o primeiro momento e por toda dedicação nesses anos. Sua aula foi a faísca para eu descobrir o meu lugar na biologia.

A minha orientadora, Athaline, que em 2020 me recebeu abertamente, aceitando a missão de me ensinar e desde então vem fazendo isso com a maior paciência, não hesitando em me ajudar nunca. Obrigada por me ensinar tanto nesses quatro anos, com tanto zelo. Seu carinho e dedicação são notórios e com certeza fizeram e ainda fazem a diferença no rumo que minha vida acadêmica tomou.

Ao LabFito, obrigada por me receberem tão bem, pelas oportunidades de crescimento, por ter me ensinado muito e ainda continuar ensinando. Aos amigos que

la fiz, sou muito grata por cada um de vocês. Obrigada por tornarem meus dias mais leves mesmo quando o experimento não dá certo. Obrigada pelos cafés.

Agradeço a todos os amigos que fiz tanto na universidade quanto fora dela, cada um de vocês foi importante para que eu trilhasse esse caminho. Com certeza, graças a vocês meus dias foram mais alegres e coloridos.

Ao CNPq que concedeu a bolsa de iniciação científica e permitiu que eu obtivesse mais conhecimento.

Se somos um mosaico de cada um que já passou por nossas vidas, sou imensamente feliz de ter cruzado e tido a oportunidade de aprender com cada um de vocês. Espero conseguir transmitir para os outros um pouco do que cada um já me deu, para que eles sejam tão imensamente abençoados como eu sou em ter cruzado com cada um de vocês.

Obrigada a todos vocês, por tanto e por tudo. Amo cada um de vocês.

*"Estranho sobre aprender: quanto mais longe eu vou,
mais vejo o que nunca soube que sequer existia."
— Flores para Algernon, Daniel Keyes.*

*"A vida é infinitamente mais estranha do que tudo
que a mente humana seria capaz de inventar."
— Sherlock Holmes, Arthur Conan Doyle.*

RESUMO

Praelongorthezia praelonga é uma espécie de cochonilha considerada inseto-praga por parasitar diversas plantas, dentre elas a aceroleira, goiabeira, cafeeira e plantas de citrus. Seu controle é normalmente feito com agentes químicos que são nocivos para o homem, meio ambiente e animais. Agentes biocontroladores, incluindo os fungos entomopatogênicos, vêm sendo estudados como alternativas sustentáveis para o controle desse inseto-praga. Contudo, em laboratório, os fungos entomopatogênicos podem perder sua virulência, afetando sua capacidade de controlar o inseto-alvo. O revigoramento torna-se uma etapa importante para recuperar a virulência de fungos entomopatogênicos. Em estudos anteriores, *Fusarium caatingaense* apresentou bons resultados no controle da cochonilha *Dactylopius opuntiae*. Esse estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros biológicos de *F. caatingaense* antes e após o seu revigoramento e testar sua patogenicidade contra *P. praelonga*. Cinco isolados foram revigorados no cupim *Nasutitermes corniger* e os parâmetros biológicos crescimento micelial, germinação dos conídios, esporulação e a presença ou ausência de diferentes estruturas fúngicas foram avaliados nos isolados antes e após o revigoramento. O teste de patogenicidade contra *P. praelonga* foi realizado com os isolados URM 6778 e URM 6779, que melhor responderam ao revigoramento. Esses foram testados nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 . A avaliação da mortalidade foi realizada a cada dois dias durante dez dias. Após o revigoramento, todos os isolados obtiveram melhora para a maioria dos parâmetros biológicos avaliados. O crescimento micelial observado antes e após o revigoramento dos fungos foi semelhante. As taxas de germinação ultrapassaram 95% para todos os isolados. A esporulação dos isolados revigorados apresentou melhora significativa em comparação aos não revigorados. URM 6778 e URM 6779 que obtiveram melhora tanto na germinação quanto na esporulação foram utilizados no teste de patogenicidade contra *P. praelonga*, observando-se, para ambos os isolados, 0% de mortalidade confirmada. Apesar de *Fusarium* ter um histórico promissor contra hemípteras, neste estudo ele se mostrou ineficaz no controle de *P. praelonga*.

Palavras-chave: Controle biológico; Hemiptera; Inseto-praga; Interação patógeno-hospedeiro; Virulência.

ABSTRACT

Praelongorthezia praelonga is a scale insect species considered a pest for parasitizing various plants, including barbados cherry, guava, coffee and citrus plants. Its control is usually performed with chemical agents that are harmful to humans, the environment, and animals. Biocontrol agents, including entomopathogenic fungi, have been studied as sustainable alternatives for controlling this pest. However, in the laboratory, entomopathogenic fungi may lose their virulence, affecting their ability to control the target insect. Revigoration becomes an important step to recover the virulence of entomopathogenic fungi. In previous studies, *Fusarium caatingaense* showed good results in controlling the scale insect *Dactylopius opuntiae*. This study aimed to evaluate the biological parameters of *F. caatingaense* before and after its revigoration and to test its pathogenicity against *P. praelonga*. Five isolates were revigorated in the termite *Nasutitermes corniger*, and the biological parameters of mycelial growth, conidial germination, sporulation, and the presence or absence of different fungal structures were evaluated in the isolates before and after revigoration. The pathogenicity test against *P. praelonga* was performed with isolates URM 6778 and URM 6779, which responded best to revigoration. These were tested at concentrations of 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 . Mortality was assessed every two days over ten days. After revigoration, all isolates showed improvement for most evaluated biological parameters. The mycelial growth observed before and after the revigoration of the fungi was similar. Germination rates exceeded 95% for all isolates. Sporulation of the revigorated isolates showed significant improvement compared to the non-revigorated ones. URM 6778 and URM 6779, which improved in both germination and sporulation, were used in the pathogenicity test against *P. praelonga*, and for both isolates, 0% confirmed mortality was observed. Despite *Fusarium* having a promising history against hemipterans, it proved ineffective in controlling *P. praelonga* in this study.

Keywords: Biological control; Hemiptera; Host-pathogen interaction; Pest insect; Virulence.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Fundamentação teórica.....	14
3.1. Fungos entomopatogênicos	14
3.1.1. Mecanismo de ação dos fungos entomopatogênicos	15
3.1.2 Métodos de estocagem de fungos entomopatogênicos cultiváveis e suas implicações	17
3.1.3. Revigoração de fungos entomopatogênicos.....	20
3.2 Fungos entomopatogênicos no controle biológico	21
3.2.1 Principais gêneros de fungos utilizados no controle biológico de insetos..	23
3.2.2 Controle biológico de insetos por <i>Fusarium</i>	25
3.3 <i>Praelongorthezia praelonga</i> (Hemiptera, Ortheziidae)	26
3.3.1 Características gerais	26
3.3.2 Ciclo biológico.....	27
3.3.3 Controle da <i>Praelongorthezia praelonga</i>	29
4. Materiais e métodos	30
4.1 Fungos	30
4.2 Análise dos aspectos biológicos de <i>Fusarium caatingaense</i> antes e após o revigoração em <i>Nasutitermes corniger</i>	31
4.3 Avaliação da patogenicidade de <i>Fusarium caatingaense</i> contra <i>Praelongorthezia praelonga</i> <i>in vitro</i>	32
4.4 Análise dos dados.....	32
5. Resultados	33
5.1. Análise dos aspectos biológicos	33
5.1.1. Microestruturas	33
5.1.2 Germinação	36

5.1.3. Crescimento micelial.....	36
5.1.4. Esporulação.....	39
5.2. Testes de patogenicidade de <i>Fusarium caatingaense</i> contra <i>Praelongorthezia praelonga</i>	39
6. Discussão.....	40
7. Conclusão	43
8. Referências	44

1. Introdução

Fungos entomopatogênicos são microrganismos diversos que atuam como parasitas facultativos ou obrigatórios, infectando e eliminando insetos e outros artrópodes. Com alta capacidade de esporulação, desempenham um papel crucial no controle natural de insetos-praga (Delgado & Murcia, 2011; Islam *et al.*, 2021). Esses fungos são capazes de controlar artrópodes e insetos, podendo ser encontrados em epizootias (Mantzoukas *et al.*, 2022). Sua obtenção ocorre por meio do isolamento de substratos variados, como solo, folhas e água, e são armazenados de diversas formas após o isolamento (Unfer *et al.*, 2019; Elkhateeb *et al.*, 2021).

Os métodos de preservação mais comuns, empregados em laboratórios e micotecas, incluem a liofilização, a estocagem em água ou óleo mineral e o armazenamento em meio de cultura sólido. Entretanto, a longo prazo e após excessivas repicagens, os fungos entomopatogênicos podem ter sua viabilidade reduzida, havendo a necessidade de revigoramento (Morgan *et al.*, 2006; Neufeld & Oliveira, 2008; Costa *et al.*, 2020).

O revigoramento de fungos entomopatogênicos é um processo no qual o fungo é submetido ao contato com seu hospedeiro, geralmente insetos aos quais é patogênico, visando a melhora da esporulação, germinação, crescimento micelial e virulência (Lopes *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2016). Por exemplo, *Fusarium caatingaense* é um fungo entomopatogênico que vem sendo testado quanto à sua patogenicidade para diferentes espécies de insetos (Carneiro-Leão *et al.*, 2017; Diniz *et al.*, 2020a; Diniz *et al.*, 2020b). Por ter se mostrado um excelente patógeno do cupim arborícola *Nasutitermes corniger*, *F. caatingaense* vem sendo revigorado neste inseto (Diniz *et al.*, 2020b; Diniz *et al.*, 2024).

O gênero *Fusarium* é frequentemente relatado em associações com insetos (Lahlali *et al.*, 2022; Diego-Nava *et al.*, 2023). Diferentes estudos têm avaliado o seu potencial no controle de insetos das ordens Thysanoptera (Panyasiri *et al.*, 2007), Lepidoptera (Munshi *et al.*, 2008), Diptera (Mohanty *et al.*, 2008), Hymenoptera (Wenda-Piesik *et al.*, 2009), Coleoptera (Sharma *et al.*, 2012), Blattodea (Diniz *et al.*, 2020b) e Hemiptera (Santos *et al.*, 2016), com melhores resultados observados para insetos desta última ordem. Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, isolados de *F. caatingaense* sozinho e em combinação com extratos botânicos apresentaram resultados satisfatórios contra a cochonilha *Dactylopius opuntiae*

(Hemiptera: Dactylopiidae) em condições de laboratório (Santos *et al.*, 2016; Velez *et al.*, 2019), casa de vegetação (Diniz *et al.*, 2020a) e campo (Carneiro-Leão *et al.*, 2017; Diniz *et al.*, 2024).

Praelongorthezia praelonga Douglas (Hemiptera, Ortheziidae) é uma cochonilha desprovida de carapaça e recoberta de cera, o que lhe garante uma coloração branca e a denominação popular de piolho-branco (Schinor *et al.*, 2011; Cesnik *et al.*, 2003). *Praelongorthezia praelonga* é encontrado em plantas de citros, aceroleiras, cafeeiros, goiabeiras além de hospedeiros alternativos como as plantas ornamentais (*Coleus* sp., *Acalypha* sp., *Hibiscus* sp., *Patchystachys lutea*, *Croton* sp. *Bougainvillea* sp.) e espécies daninhas. Sua ação é capaz de causar perdas econômicas significativas, bem como custos elevados para o seu controle (Garcia-Roa, 1995; Neves *et al.*, 2010; Benvenga *et al.*, 2017).

O controle de *P. praelonga* é feito a partir da aplicação de inseticidas químicos. Contudo, o ovissaco de estrutura cerosa presente nas fêmeas é capaz de proteger os ovos e as ninfas da ação de defensivos químicos, proporcionando futuras reinfestações e recorrentes aplicações dos agentes químicos de controle (Benvenga *et al.*, 2017). Por sua vez, o uso de agrotóxicos acarreta em diferentes problemas à saúde humana e animal, contamina o meio ambiente e leva à morte de organismos não-alvos (Sanches *et al.*, 2021).

Como visto, o revigoramento de fungos entomopatogênicos é necessário, principalmente quando estes são armazenados por longos períodos e passam por repicagens sucessivas. Uma forma de verificar a viabilidade do fungo é avaliar parâmetros biológicos como crescimento, germinação, esporulação e a presença ou ausência de estruturas de resistência (Lopes *et al.*, 2016; Feijó *et al.*, 2009). Esse processo pode ser feito antes de submeter o fungo a testes de patogenicidade. Em caso de baixa viabilidade, o revigoramento é recomendado para garantir que o resultado observado na avaliação da patogenicidade não seja influenciado pelas condições biológicas do fungo. Neste estudo, cinco isolados de *F. caatingaense* (URM 6807, URM 6793, URM 6779, URM 6778 e URM 6792) foram submetidos ao revigoramento em *N. corniger* e os seus parâmetros biológicos foram avaliados antes e após a realização desse processo. Os isolados que apresentaram melhores resultados após o revigoramento foram selecionados para a verificação de sua patogenicidade contra *P. praelonga*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os parâmetros biológicos de isolados de *Fusarium caatingaense* antes e após o revigoramento em *N. corniger*, bem como sua capacidade entomopatogênica sobre o inseto *P. praelonga*.

2.2 Objetivos específicos

- a. Analisar os parâmetros biológicos (esporulação, germinação, crescimento micelial e produção de microestruturas) de cinco isolados de *F. caatingaense* antes e após o revigoramento;
- b. Verificar se o processo de revigoramento afeta os parâmetros biológicos dos cinco isolados de *F. caatingaense*;
- c. Selecionar os isolados promissores após revigoramento para teste de patogenicidade contra *P. praelonga*.
- d. Determinar a patogenicidade e virulência dos isolados selecionados em diferentes concentrações contra *P. praelonga in vitro*.

3. Fundamentação teórica

3.1. Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos são um grupo diverso microrganismos que podem diferir tanto filogeneticamente, morfológicamente e ecologicamente entre si, porém são capazes de infectar e matar insetos e outros artrópodes, atuando como parasitas facultativos ou obrigatórios com grande capacidade de esporulação e contribuindo para o controle natural de insetos-praga no meio ambiente (Delgado & Murcia, 2011; Islam *et al.*, 2021; Mantzoukas *et al.*, 2022).

O conhecimento sobre fungos entomopatogênicos remonta a tempos antigos, com registros documentados por chineses e egípcios que já observavam doenças em insetos, como abelhas e bicho-da-seda. Em 1835, Agostino Bassi documentou pela primeira vez uma doença causada por um patógeno fúngico em larvas do bicho-da-seda mais tarde denominado *Beauveria bassiana* (Fontes & Valadares-Inglis, 2020). Desde então, cerca de 35 gêneros e mais de 400 espécies foram identificados como agentes entomopatógenos, com aproximadamente 1800 associações entre fungos e diferentes espécies de insetos (Kidanu & Hagos, 2020).

Os fungos entomopatogênicos apresentam características e modos de ação que os tornam eficazes no controle de populações de insetos, sendo encontrados naturalmente em epizootias (Mantzoukas *et al.*, 2022). Esses organismos possuem o maior número de táxons patogênicos a insetos, destacando-se por sua diversidade filogenética. Aproximadamente 80% das doenças em insetos são causadas por fungos, que podem levar seus hospedeiros à morte (Mora *et al.*, 2017). A relação entre um patógeno e um inseto é estabelecida quando o hospedeiro é naturalmente infectado, seja em condições de campo ou em laboratório, e o propágulo infeccioso é produzido (Kidanu & Hagos, 2020).

3.1.1. Mecanismo de ação dos fungos entomopatogênicos

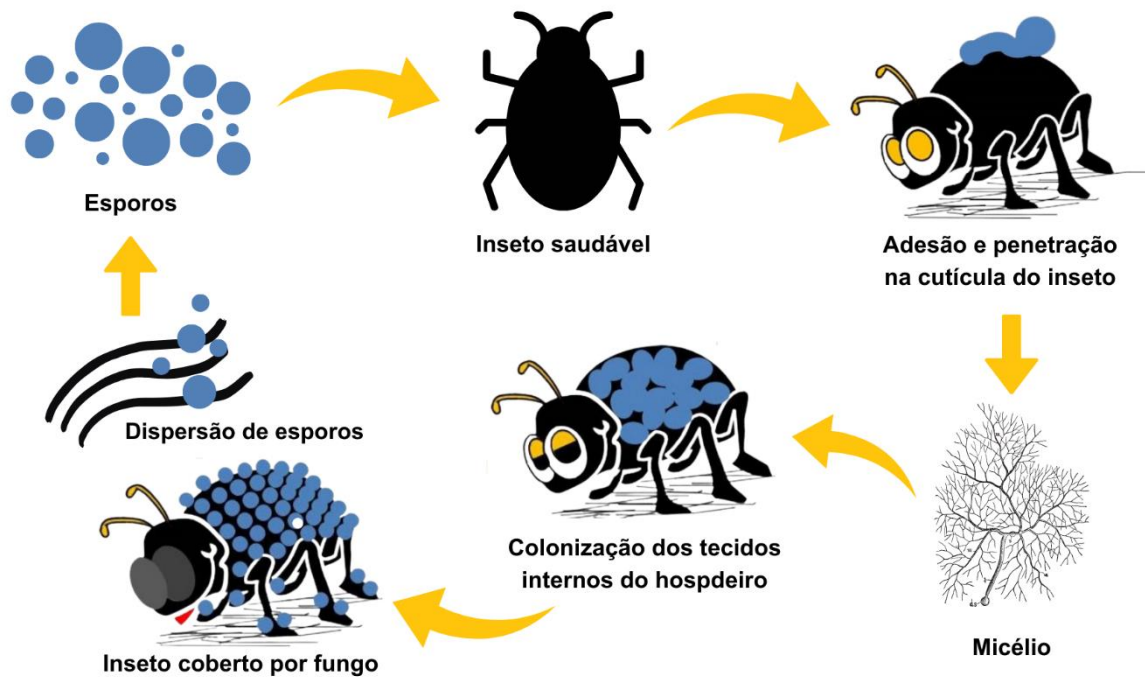
Para serem classificados como agentes entomopatogênicos, os microrganismos devem ser capazes de atacar insetos e utilizá-los como hospedeiros para desenvolver parte ou todo o seu ciclo de vida (Mora *et al.*, 2017; Prajapati *et al.*, 2023). Para que ocorra uma infecção bem-sucedida o fungo precisa liberar grande quantidade de esporos, que serão transportados pela água, vento e até mesmo por animais infectados. Ao encontrar com o inseto hospedeiro os esporos precisam conseguir aderir ao seu tegumento. Após isso, há o fator da própria imunidade do hospedeiro, como a presença de diversos compostos com ação antifúngica, antibacteriana e antiviral (Elkhateeb *et al.*, 2021; Mora *et al.*, 2017).

Diferente de outros microrganismos, o processo infeccioso fúngico acontece através do contato do esporo com o alvo. O processo de infecção do inseto alvo pode ser estabelecido em 6 estágios: adesão dos esporos; germinação; penetração através do tegumento, feridas ou traqueia; colonização da hemolinfa; formação e proliferação das hifas e esporulação e surgimento de novos propágulos (Elkhateeb *et al.*, 2021).

Ao penetrar a cutícula do inseto através de partes não esclerotizadas, feridas ou pelo aparelho bucal, a célula fúngica se prolifera na hemocèle, músculos e outros tecidos do hospedeiro, prejudicando seu sistema imune a fim de completar o processo infectivo (Mora *et al.*, 2017). O fungo utiliza uma combinação de força mecânica e enzimática para penetrar na cutícula do inseto. Enzimas como quitinases, lipases e proteases degradam as camadas da cutícula. Após conseguir invadir e colonizar os tecidos internos do hospedeiro, em muitos casos, o fungo causa a morte do inseto entre 3 e 7 dias após a infecção. Após o esgotamento das reservas energéticas do

hospedeiro, as hifas do fungo crescem para fora do corpo e produzem estruturas reprodutivas que liberam esporos no ambiente (Figura 1) (Mora *et al.*, 2017; Elkhateeb *et al.*, 2021)

Figura 1. Esquema representativo do ciclo infeccioso de fungo em um inseto hospedeiro.



Fonte: Rigobelo (s.d) adaptado pelo autor (2024).

A externalização do agente fúngico depende diretamente das condições de temperatura e umidade do local. Caso seja favorável, as hifas então poderão atravessar o tegumento do inseto a partir de áreas menos esclerotizadas. Após externar, as hifas iniciam o processo de esporulação dentro de 24 a 48h, a depender, novamente, de condições como umidade e da síntese de antibióticos para prevenção do crescimento de outros organismos oportunistas. Ao se desenvolver, as hifas formam conidióforos e esporos assexuados cuja função é a disseminação do isolado fúngico. Outros fatores ambientais, como umidade e temperatura, são responsáveis por controlar a sobrevivência dos esporos no ambiente, sendo considerados críticos para o desenvolvimento de epizootias (Mora *et al.*, 2017).

3.1.2 Métodos de estocagem de fungos entomopatogênicos cultiváveis e suas implicações

Pesquisas envolvendo o reino Fungi vêm avançando, trazendo consigo resultados dos benefícios e desvantagens destes organismos tão diversos. Capazes de crescer nos mais diferentes habitats, dependendo das condições de nutrientes, temperatura e umidade, os fungos têm despertado interesse em diversas áreas da vida humana (Costa *et al.*, 2020). Com os estudos, surgiu a necessidade de armazenar esses seres de algum modo, para que sua utilização fosse novamente possível. Portanto, isolados fúngicos coletados e estudados são comumente depositados em Coleções de Culturas em Micotecas, cuja função é garantir a preservação da linhagem, manter a sua vitalidade e proporcionar estabilidade genética, evitando mutações (Dellaretti, 2014; Santos *et al.*, 2016).

Coleções fúngicas são centros de conservação da biodiversidade encarregados de obter, armazenar e disponibilizar organismos relevantes para a pesquisa científica, como, estudos de cunho taxonômico, epidemiológico, aplicações tecnológicas e atividades de ensino (Cavalcanti, 2010). O armazenamento das primeiras culturas microbianas se deu no início do século XX e eram inicialmente mantidas por repicagens periódicas e sucessivas, acarretando na perda de material, alterações fisiológicas, diminuição da viabilidade, capacidade de esporulação e patogenicidade, o que levou a busca por métodos mais eficientes (Cavalcanti, 2010).

Diversas técnicas foram desenvolvidas ao longo do tempo, para o armazenamento fúngico, visando minimizar a necessidade de interferência humana e induzir o organismo a um estado de dormência artificial (Cavalcanti, 2010). O objetivo é mantê-lo viável, com suas características genéticas, fisiológicas e anatômicas preservadas. Não existe um método único para o armazenamento de fungos entomopatogênicos (Borgio *et al.*, 2012). A escolha da técnica adequada para preservação desses fungos depende das particularidades do isolado, vantagens e desvantagens do método utilizado, do custo de manutenção, importância do acervo e da disponibilidade de equipamentos (Dellaretti, 2014. Unfer *et al.*, 2019). Muitas vezes, é preciso utilizar tentativa e erro para determinar o método mais adequado. Caso o patógeno não seja completamente conhecido, é recomendável utilizar mais de um método de preservação (Borgio *et al.*, 2012).

Segundo Costa & Ferreira (1991), os métodos de preservação de microrganismos podem ser organizados de três formas, sendo eles à curto, médio e longo prazo. No método de curto prazo utiliza-se o repique contínuo, que, apesar de consumir tempo, costuma ser comumente utilizado no dia a dia em laboratórios para pequenas coleções, que são constantemente utilizados em períodos curtos de tempo (inferiores a um ano). Essa técnica consiste em transferir fragmentos de uma cultura fúngica para um outro meio de cultura esterilizado, específico para cada organismo, seguido do crescimento e armazenamento em placas e tubos vedados, ao abrigo da luz e em baixas temperaturas (Murray, 2003; Romeiro, 2006; Unfer *et al.*, 2019). As vantagens incluem o baixo custo de execução e a simplicidade dos equipamentos necessários. A desvantagem, é que o contínuo uso da técnica apresenta vulnerabilidade a microrganismos diversos, como outros fungos e bactérias, que podem contaminar a nova cultura, ocasionando a perda de cepas e, consequente, desperdício de insumos e gastos materiais (Costa *et al.*, 2020; Unfer *et al.*, 2019). Outra desvantagem é a demanda frequente por recursos humanos para realizar as repicagens.

A médio prazo, pode-se citar a técnica de Castellani (1939), cuja literatura afirma ser um método de baixo custo, fácil execução e com diversas vantagens. Nessa técnica, os isolados são armazenados em água destilada esterilizada ou solução salina à temperatura ambiente, em pequenos frascos, que são armazenados em pé, ocupando pequenos espaços físicos e com pouca influência de outros microrganismos. Os isolados são inicialmente cultivados em meio sólido (ágar inclinado) e, após o crescimento, os tubos são cobertos por uma das soluções citadas (Neufeld & Oliveira, 2008; Costa *et al.*, 2020). Outra técnica semelhante, que utiliza óleo mineral estéril, possui o mesmo princípio da técnica de Castellani, sendo o óleo aplicado após o crescimento microbiano. O intuito é limitar o oxigênio disponível, a fim de obter um metabolismo lento por parte do fungo, alcançando uma estabilidade entre a morte e o crescimento do isolado. Dessa forma, as cepas podem ser mantidas viáveis por um período de dois a três anos, em temperaturas entre 4°C e 20°C a depender do organismo (Costa *et al.*, 2020; Rhodes, 1957; Romeiro, 2006; Canhos *et al.*, 2004).

Ainda a médio prazo, podemos citar o método da sílica-gel, desenvolvido por Perkins (1962) para espécies de *Neurospora*, que consiste na proteção dos esporos

em leite desnatado e armazenamento dos mesmos em sílica-gel. A cultura observada por Perkins permaneceu viável por 4 a 5 anos. Entre as vantagens desse método, destacam-se a fácil reativação dos esporos, o baixo custo e a ausência de equipamentos sofisticados. Além disso, esse método aumenta o tempo de preservação da cultura, quando exposta a baixas temperaturas. Contudo, ao tentar replicar o método com espécies dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*, este se mostrou ineficaz (Smith & Onions, 1983; Nakasone *et al.*, 2004; Unfer *et al.*, 2019).

A longo prazo, foram desenvolvidas técnicas como a criopreservação e liofilização, sendo essa última amplamente utilizada em coleções, com a viabilidade de alguns espécimes podendo chegar até 21 anos. A liofilização consiste na retirada da água intracelular de materiais congelados por sublimação (passagem da água do estado sólido para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido), evitando a formação de cristais de gelo (Morgan *et al.*, 2006). Esse procedimento envolve três etapas: a primeira é o congelamento, que promove a inércia do material, gerando uma interrupção das atividades metabólicas; a segunda é a desidratação primária, responsável por remover a água pela sublimação, que ocorre a vácuo e com adição de calor; por fim, a terceira etapa consiste na desidratação secundária, removendo a água que não formou gelo na primeira etapa e conseqüentemente não sofreu sublimação (Costa *et al.*, 2009). Ao término do processo, os organismos liofilizados devem ser armazenados em baixa temperatura, umidade, ausência de luz e contaminantes (Morgan *et al.*, 2006). Embora a liofilização possa promover uma longa durabilidade, nem todos os organismos suportam o processo de desidratação, além disso, o equipamento necessário para o processo é de alto custo (Unfer *et al.*, 2019).

A criopreservação, por sua vez, consiste no armazenamento do material em temperaturas abaixo de zero, podendo ser em freezers (-20°C), ultrafreezers (-80°C) ou em containers de nitrogênio líquido, chegando a temperaturas ultra baixas ficando entre -150°C a -196°C (Wolfe & Bryant, 2001). No processo de criopreservação, existem duas etapas críticas que podem afetar as células e causar a perda da viabilidade: a primeira ocorre entre 19°C e 8°C, quando os lipídeos da membrana plasmática passam do estado líquido para o estado de gelo; a segunda ocorre entre -6°C e -15°C, quando se dá a cristalização e a concentração do soluto dentro da célula. Essas etapas são um desafio no processo de criopreservação, pois as células precisam suportar a dupla transição durante o congelamento e o descongelamento

(Costa & Ferreira, 1991; Oliveira, 2007). Para minimizar esses efeitos, substâncias crioprotetoras são utilizadas. Apesar da vantagem em manter os organismos preservados, o sucesso da técnica depende de diversos fatores, incluindo o tipo de microrganismo, a taxa de resfriamento e o requerimento de profissionais capacitados para o manuseio de aparelhagem específica, o que causa um maior custo operacional (Costa *et al.*, 2009; Unfer *et al.*, 2019).

Como há diferentes técnicas, cada uma com suas vantagens e desvantagens, a escolha do método deve ser feita baseada na especificidade de cada organismo e o que o mesmo é capaz de suportar sem perder sua funcionalidade, procurando manter o organismo o mais estável possível (Unfer *et al.*, 2019).

3.1.3. Revigoração de fungos entomopatogênicos

Para que um fungo seja considerado um agente promissor de biocontrole, é necessário avaliar parâmetros de virulência, os quais envolvem etapas como adesão ao inseto-alvo, germinação, diferenciação e penetração. Em cada uma dessas etapas, podem existir fatores interferentes que comprometem a eficácia do fungo como agente de biocontrole (Maina *et al.*, 2018). Embora as técnicas de armazenamento garantam a preservação dos organismos, a estocagem pode comprometer a virulência dos fungos. Isso pode ocorrer devido ao tempo que ficam armazenados, aos diversos repiques e à exposição a altas temperaturas. Portanto, o revigoração é um processo que pode ser realizado para restaurar a viabilidade fúngica. No caso de fungos entomopatogênicos, insetos hospedeiros são utilizados como uma opção para o revigoração fúngico (Lopes *et al.*, 2016; Fontes & Valadares-Inglis, 2020).

As principais características que precisam ser mantidas com a preservação são pureza, viabilidade e estabilidade genética (Nakasone *et al.*, 2004). Para garantir tais características é necessário verificar a morfologia, crescimento e comportamento patogênico do fungo. O conhecimento prévio de como o fungo se comporta é importante para detectar quaisquer alterações durante o armazenamento do isolado e, quando necessário, indicar o revigoração do mesmo (Humber, 1997).

Oliveira *et al.* (2011) ao estudar diferentes técnicas de armazenamento para *B. bassiana*, evidenciou que o armazenamento por congelamento no glicerol seria a melhor técnica, pois permitiu uma viabilidade de 100% dos conídios. Marques *et al.*

(2000) chegou a constatar a virulência de 100% de conídios de *B. bassiana* puros que foram armazenados em freezers durante 80 meses, causando uma mortalidade de 94% em lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae).

A virulência de um fungo entomopatogênico é uma característica importante, principalmente quando se trata da seleção destes para uso no controle biológico. Quanto mais rápido o fungo é capaz de matar o seu alvo, melhor é tido para o controle de infestações agrícolas (Bezerra, 2018). O revigoramento de fungos entomopatogênicos costuma ser realizado antes de testes de patogenicidade contra insetos. No estudo de Liu *et al.* (2021) os autores utilizaram como inseto hospedeiro *Tenebrio molitor* para o revigoramento de *Beauveria* e *Metarhizium*. As análises dos parâmetros biológicos indicaram altas taxas de recuperação dos isolados, com uma maior taxa de produção de conídios. Os testes também mostraram uma tendência de um biocontrole eficaz contra *Spodoptera litura*. No estudo realizado por Lopes *et al.* (2016) foram relatados melhoras nos padrões biológicos de isolados de *Isaria* (Persoon) após passagem pelo inseto *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), com uma maior quantidade de estruturas vegetativas e reprodutivas.

Os insetos utilizados em processos de revigoramento de fungos entomopatogênicos precisam ser susceptíveis ao fungo que será revigorado (Ribeiro, 2020; Putri & Kim, 2024). O cupim *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae) foi susceptível a ação de *Cordyceps javanica* (= *Isaria javanica*), estimulando uma melhora nos parâmetros biológicos do fungo (Lopes *et al.*, 2011). Lopes *et al.* (2008) demonstram que *C. gestroi* pode ser uma opção para o revigoramento de *Cordyceps farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*). Após submeterem o fungo a uma infecção nessa espécie de cupim, os autores observaram aumento no diâmetro da colônia fúngica para o isolado URM 4995. Houve o acréscimo do número de conidióforos e conídios produzidos pelo fungo, bem como apressórios foram observados em maior proporção.

3.2 Fungos entomopatogênicos no controle biológico

Com a agricultura moderna houve um aumento no uso de pesticidas sintéticos (Lahlali *et al.*, 2022), como piretróides, fipronil, clorantianiliprole, ciantraniliprole, novaluron, phoxim, dentre outros. Apesar de controlarem mais rapidamente as

infestações de insetos, trazem como consequência nocividades à saúde humana e animal, prejudicando o ecossistema local e tornando os insetos-pragas resistentes (Lahlali *et al.*, 2022; Bihal *et al.*, 2023). O uso exacerbado desse tipo de controle, torna importante a busca por alternativas menos prejudiciais e com mais especificidade ao inseto-alvo. Embora haja o avanço de pesquisas genéticas, capazes de gerar alimentos modificados mais resistentes a pragas, de tamanho maiores e até mesmo mais bonitos, essa prática pode vir a fortalecer um gene patógeno que seja resistente, sendo necessário o uso de outras vias de controle (Lahlali *et al.*, 2022).

O biocontrole ou controle biológico é uma técnica de manejo alternativo de pragas, envolvendo a ação de inimigos naturais, como predadores, parasitas ou patógenos (Parra *et al.*, 2002; Brechelt, 2004). Esse tipo de controle é menos nocivo em relação a inseticidas químicos, trazendo uma maior segurança para o meio ambiente (Abd-Elgawad, 2019; Baker *et al.*, 2020).

Os fungos, de modo geral, são uma via bastante explorada por serem inimigos naturais de uma grande variedade de insetos, possuírem baixa toxicidade para organismos não-alvo e terem impacto ambiental mínimo. Eles podem ser combinados com outros agentes biocontroladores e usados em forma de pó, *sprays* e iscas, além de se adaptarem ao meio ao qual são inseridos. Há casos documentados em que a produção agrícola aumentou em até 40% com o uso de fungos entomopatogênicos (Lahlali *et al.*, 2022). Embora os custos iniciais para desenvolver tecnologias capazes de melhorar a produção sejam relativamente altos, uma vez desenvolvida, a sua produção tende a ser mais barata. Como consequência, o acesso a bioinseticidas se torna mais fácil e a procura por parte dos produtores agrícolas aumenta (Diego-Nava *et al.*, 2023).

O Brasil possui um dos maiores programas de controle de insetos-pragas feito por fungos. O registro de produtos biológicos feito por empresas cresceu 83% em menos de uma década. Anualmente são tratados mais de 750 mil hectares de cana-de-açúcar e 250 mil hectares de pastagens com *M. anisopliae* s.l. contra cercopídeos (Li *et al.*, 2010). De acordo com Costa *et al.* (2022), há aproximadamente 230 produtos comercializados à base de microrganismos ou agentes biológicos de controle (parasitas ou predadores) registrados no Brasil. Em 2020, o país atingiu o recorde de registro de biopesticidas com 95 produtos registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Em 2021 foram registrados 65 produtos (Moraes, 2022). Em 2023,

o MAPA registrou 90 produtos de baixo impacto (de origem biológica, fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica, semioquímicos e reguladores de crescimento). Dentre a composição de alguns desses ativos biológicos há a presença de *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma asperellum* (Brasil, 2023). A Portaria nº 1127 de junho de 2024 elevou para 60 o número de especificações de referência (ER) de produtos fitossanitários aprovados para uso na agricultura orgânica e convencional, ampliando o leque de produtos de baixo impacto que podem ser utilizados, totalizando até o final de maio mais de 300 produtos de baixo impacto registrados (Brasil, 2024).

Os fungos e demais microrganismos são de grande interesse para o controle biológico, pois podem ser produzidos em massa, de forma barata e possuem menos restrições legais e éticas comparados aos químicos (Unfer *et al.*, 2019). No entanto, o uso de agentes biopesticidas a base de bactérias, nematoides e fungos, enfrentam alguns desafios, dificultando a disseminação desse tipo de controle. Esses desafios incluem a eficácia variável e as dificuldades de formulação (Lahlali *et al.*, 2022; Diego-Nava *et al.*, 2023). Apesar das dificuldades, os fungos entomopatogênicos se destacam devido a uma combinação de fatores, como a facilidade de aplicação, métodos simples de produção e ampla disponibilidade de cepas identificadas (St Leger & Wang, 2010). No campo, após ocasionar a morte de insetos, o corpo destes tornam-se fontes de novos esporos, permitindo a continuidade do ciclo de vida do fungo em novos hospedeiros. A atuação dos fungos entomopatogênicos vai além do controle biológico de insetos. Esses organismos têm se mostrado versáteis, proporcionando benefícios como biofertilização (Jaber & Enkerli, 2017), colonização da rizosfera (Pava-Ripoll *et al.*, 2011) e promoção do crescimento de plantas (Jaber & Enkerli, 2017). Além disso, eles melhoram a absorção de nutrientes e água, conferem tolerância à seca, estimulam as defesas das plantas e induzem resistência a estressores bióticos e abióticos. Por meio de uma relação endofítica, os fungos entomopatogênicos também afetam negativamente insetos herbívoros a partir de mecanismos não patogênicos, como antibioses, antixenose e resistência induzida (Dara, 2019).

3.2.1 Principais gêneros de fungos utilizados no controle biológico de insetos

Os fungos são organismos presentes no mundo todo e em diversos tipos de ecossistemas, o seu uso no controle biológico de insetos vem crescendo cada vez

mais. Porém, apenas alguns desses fungos foram estudados para o desenvolvimento de micoínseticidas, o que inclui representantes dos filos Ascomycota, Entomophthoromycota e Microsporidia (Fontes & Valadares-Inglis, 2020; Prajapati *et al.*, 2023). A maior parte dos fungos entomopatogênicos são encontrados no filo Ascomycota e Entomophthoromycota, nas ordens Hypocreales e Entomophthorales, respectivamente (Mora *et al.*, 2017).

No filo Ascomycota, o gênero *Hirsutella* alcançou visibilidade na década de 70 na Flórida pelo biocontrole do ácaro *Phyllocoptruta oleivora* com um produto comercial a base de *H. thompsonii*. Posteriormente foram relatadas outras espécies do gênero patogênicas a insetos das ordens Hemiptera, Coleoptera, Dípteras, Psocoptera e Lepidoptera. A família Cordycipitaceae contempla vários fungos de importância econômica, dentre eles *Beauveria*, *Isaria* e *Lecanicillium*. Outra família que abriga gêneros importantes é Clavicipitaceae, com destaque para *Metarhizium* e *Aschersonia* (Fontes & Valadares-Inglis, 2020).

No filo Entomophthoromycota, o único que atingiu *status* comercial foi *Conidiobolus thromboides*, relatado como entomopatógeno de alguns hemípteros. Um clássico micoínseticida utilizado no controle de gafanhotos e outros ortópteros pertence ao filo Microsporidia e tem como base *Paranosema locustae* (Fontes & Valadares-Inglis, 2020). Outros gêneros fúngicos com importância para o controle são *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Aschersonia*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Rhizopus* e *Fusarium* (Lopez-Llorca & Hans-Börje, 2001; Fao, 2003).

Segundo Ravensberg (2015), até a primeira década do segundo milênio já foram desenvolvidos e comercializados mais de 110 produtos à base de fungos por diferentes empresas como Byers, BASF, Monsanto, DuPont e Arysta (Lopez-Llorca & Hans-Börje, 2001; Fao, 2003). Os gêneros mais conhecidos, pesquisados e utilizados são *Metarhizium* e *Beauveria*. Isso se deve à ocorrência natural desses fungos, capacidade de infectar uma ampla gama de insetos, resistência ao ambiente e alta virulência, havendo relatos da proteção a longo prazo quando aplicado contra o inseto-alvo (Diego-Nava *et al.*, 2023).

Outros gêneros fúngicos que apresentam espécies de importância para o controle biológico são *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Rhizopus*,

Trichoderma e *Fusarium* (Lopez-Llorca & Hans-Börje, 2001; Fao, 2003; Santos *et al.*, 2020; Fontes & Valadares-Inglis, 2020). Dentre estes, o gênero *Fusarium* vem se destacando em estudos como uma estratégia vantajosa para o uso em controle de insetos-praga devido a facilidade de serem cultivados em laboratório e de causar altas taxas de mortalidade contra algumas espécies de insetos. Em alguns casos, esses fungos não atuam como patógenos de plantas e apresentam especificidade ao hospedeiro. Além disso, sobrevivem como sapróbios em solos. São capazes de produzir substâncias associadas a aptidão do fungo em parasitar e matar insetos, tais como beauvericina (Leslie e Summerell, 2006; Santos *et al.*, 2020). Devido a essas características, diversas espécies do gênero vêm sendo estudadas a fim de averiguar a patogenicidade contra diferentes insetos-praga (Santos *et al.*, 2020).

3.2.2 Controle biológico de insetos por *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é comumente encontrado no solo em ecossistemas naturais e agroecossistemas, em matéria orgânica em decomposição e em associações que podem ou não ser patogênicas (Leslie & Summerell, 2006; Sharma & Marques 2018; Santos *et al.*, 2020). O gênero foi introduzido por Link (1809) e desde então vêm sendo estudado por possuir espécies patogênicas a humanos, plantas e animais (Leslie & Summerell, 2006; Santos *et al.*, 2020). A fusariose, por exemplo, é uma doença causada *Fusarium verticillioides* que leva a perdas na produtividade ao causar podridão radicular e murchas em culturas economicamente importantes, como milho, arroz, trigo e feijão. Além disso, ao infestar plantios agrícolas, *Fusarium* pode produzir micotoxinas como deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T-2, toxina HT-2 e diacetoxiscirpenol (DAS) e zearalenona (ZEA), capazes de causar doenças em humanos que variam desde dor de cabeça a morte, quando a infecção é avançada (Wang *et al.*, 2022).

Entretanto, muitos isolados de *Fusarium* são encontradas associados a plantas, principalmente na superfície de suas raízes sem causar doença. Estudos com *F. oxysporum* na rizosfera de bananeiras identificaram isolados patogênicos e não patogênicos (Sajeena *et al.*, 2020). Trabalhos publicados na década de 80 mostraram a interação de espécies de *Fusarium* com insetos atuando como patógeno ou não (Aoki *et al.* 2018, 2019; Santos *et al.* 2020).

Nos últimos anos, *Fusarium* vem se mostrando promissor na área de controle biológico com espécies patogênicas a insetos das ordens Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, Coleoptera, Diptera e Blattellidae (Santos *et al.*, 2020; Diniz *et al.*, 2020b; Prajapati *et al.*, 2023). As espécies de *Fusarium* entomopatogênicas estão distribuídas em dez complexos de espécies, com destaque para quatro deles: *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, abrigando o maior número de espécies patogênicas (Santos *et al.*, 2020). Estudos com diferentes espécies *Fusarium* têm demonstrado a capacidade desses fungos em matar insetos-praga, sendo observado elevadas taxas de mortalidade (Anwar *et al.* 2017; Tosi *et al.* 2015). Pesquisadores acreditam que espécies de *Fusarium* entomopatogênicas têm alta chance de sobrevivência no campo por atuarem como patógenos facultativos (Pelizza *et al.*, 2011). Esses fungos são capazes de produzir estruturas de sobrevivência duradouras, como clamidósporos, garantindo a sua sobrevivência no solo ou no ambiente durante anos, mesmo em condições adversas (Leslie & Summerell 2006).

3.3 *Praelongorthezia praelonga* (Hemiptera, Ortheziidae)

3.3.1 Características gerais

Praelongorthezia praelonga é uma espécie de origem neotropical que pode ser encontrada nas regiões nordeste, sul, norte e sudeste do Brasil (Garcia *et al.*, 2016). O primeiro surto da praga foi documentado por Robbs em 1947, no estado do Rio de Janeiro. De acordo com esse autor, a infestação teria começado em 1943 o que culminou no declínio da citricultura na Baixada Litorânea Fluminense. Posteriormente, Robbs também registrou vários focos de infestação no estado de Sergipe em 1973 (Cesnik *et al.*, 2003).

A cochonilha *P. praelonga* é um inseto sexualmente dimórfico. Inicialmente, machos e fêmeas são semelhantes, porém, a partir do segundo instar, os machos se direcionam para galhos, troncos ou solo, onde se reúnem em colônias e entram em uma fase intermediária de pupa eclodindo adultos alados (Weiler *et al.* 2017). Geralmente, as infestações desse inseto são visualizadas nos ramos internos das plantas hospedeiras na face abaxial das folhas. Contudo, em infestações severas, os insetos podem colonizar a face adaxial das folhas e o tronco (Parra *et al.*, 2005).

Essa espécie de cochonilha é desprovida de carapaça. Possui uma estrutura cerosa que recobre o seu corpo, proporcionando proteção e permitindo que, tanto na fase adulta quanto na fase de ninfa, o inseto tenha alta mobilidade favorecendo sua disseminação na planta. Essa mesma cera permite a disseminação do inseto no ambiente, pois confere aderência a maquinários e roupas. Contudo, a forma mais comum de disseminação é através do vento (Benvenga *et al.*, 2017). Um estudo feito por Lima em 1981 verificou que uma fêmea adulta produz cinco gerações a cada 70 dias, sendo que o ovo é inicialmente branco e liso tornando-se verde, próximo da eclosão, enquanto os ovos inférteis são de coloração marrom. Após a eclosão, o inseto passa por 4 estágios antes de atingir a fase adulta (Cesnik *et al.*, 2003).

Diferentes culturas agrícolas são afetadas pela ação de *P. praelonga* como cafeeiro, aceroleira, goiabeira, mangueira, pitangueira, mamoeiro, entre outras (Almeida, 2016). Esses insetos atacam também plantas ornamentais. Se alimentam via sucção contínua da seiva vegetal causando danos diretos e indiretos. Diretamente causam o rompimento de vasos e células, e a inserção de toxinas levando ao enfraquecimento da planta, com posterior perda de folhas, frutos e morte (Miller *et al.*, 2005). Indiretamente, facilitam o surgimento de fumagina, que afeta a fotossíntese e a transpiração das plantas, resultando em queda prematura das folhas e diminuição do valor comercial dos frutos devido a aparência indesejada (Guirado *et al.*, 2001).

3.3.2 Ciclo biológico

As ninfas permanecem dentro do ovissaco até que haja a primeira ecdise, onde acontece a migração para a planta de forma gradativa, sendo que machos e fêmeas são iguais nas primeiras fases do desenvolvimento. A principal diferença entre a primeira e segunda fase do desenvolvimento é o tamanho. Quando as ninfas machas atingem o segundo estágio de desenvolvimento, migram para o tronco da planta, onde se envolvem em uma estrutura de pseudo pupa e terminam seu desenvolvimento atingindo a fase adulta (Benvenga *et al.*, 2017).

Na fase adulta, os machos vivem cerca de 75 dias, costumam se alojar nas reentrâncias dos galhos e troncos e podem ser observados voando ao entardecer. Por possuírem somente a função reprodutiva, não são considerados prejudiciais à planta hospedeira. Quanto a sua morfologia, possuem um par de asas hialinas bem

desenvolvidas, cauda alongada formada por fios de cera, corpo azul claro recoberto por cera e pernas delgadas e finas (Barbosa *et al.*, 2007; Benvenga *et al.*, 2017) (Figura 2 A e B).

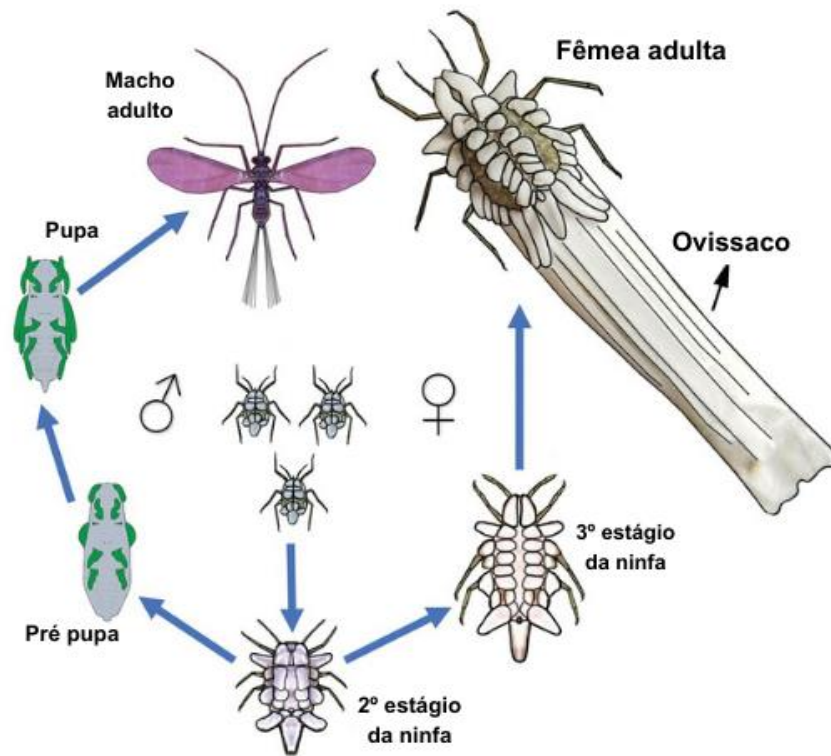
Figura 2. Macho (A) e fêmea (B) adulta de *Praelongorthezia praelonga*.



Fonte: O autor (2024).

Do 1º ao 3º estágio, as ninfas fêmeas correspondem as seguintes características: o corpo, assim que sai do ovissaco, é recoberto por uma cera branca e aumentam de volume ao iniciar a alimentação, caracterizando-se como a diferença básica entre os estágios. Para as fêmeas os estágios variam de 13 a 20 dias. No 4º estágio, as fêmeas são consideradas adultas e começam a desenvolver o ovissaco (Cesnik *et al.*, 2003) (Figura 3).

Figura 3. Esquematisação do ciclo de vida de *Praelongorthezia praelonga*.



Fonte: Kondo (2022) adaptado pelo autor.

Para as fêmeas, o período de vida dura cerca de 120 dias. A pré-oviposição dura 19-20 dias, a oviposição 42-43 dias e a pós-oviposição 24-25 dias. Quando bem desenvolvidas, as fêmeas podem medir 2,5mm. Não possuem asas, porém movimentam-se pela planta, procurando o melhor lugar para se alimentar. Apresentam 8 segmentos nas antenas, e o seu corpo é recoberto por cera branca. No dorso apresentam duas pequenas áreas esverdeadas, sem cera. Na parte superior do corpo são encontrados diversos bastonetes de cera que são alongados e se unem para formar o ovissaco, podendo medir 8mm (Cati, 1997). É dentro dessa estrutura que as fêmeas alojam os ovos e ninfas recém eclodidas (Cesnik *et al.*, 2003).

3.3.3 Controle da *Praelongorthezia praelonga*

Uma das formas de controle da *P. praelonga* é o uso de químicos. Contudo, esse tipo de controle é dificultado pelas características do inseto, que apresenta alta facilidade reprodutiva e uma ampla gama de plantas hospedeiras. Além disso, o uso de inseticidas químicos, acarreta na falta de inimigos naturais para este inseto. O ovissaco, de estrutura cerosa nas fêmeas, é capaz de proteger os ovos e as ninfas da

ação dos defensivos químicos, proporcionando futuras reinfestações e exigindo aplicações recorrentes dos agentes químicos. Quando aplicado, esse tipo de controle contamina os frutos, podendo ainda não gerar o resultado desejado. Além disso, acarreta em danos à saúde humana, animal e contamina o meio ambiente. Organismos não-alvos como os fungos entomopatogênicos, parasitoides, predadores, polinizadores e pássaros insetívoros também são afetados (Sanches *et al.*, 2021).

Como forma de obter um controle mais eficaz, o uso do controle químico aliado a óleo vegetal é indicado (Benvença *et al.*, 2017; Kondo *et al.*, 2013). Uma alternativa ao uso dos químicos são os agentes biocontroladores, incluindo outros insetos como a larva da mosca *Gitona brasiliensis* (Diptera: Drosophilidae), as joaninhas *Scymnus* sp. e *Azya luteipes* (Coleoptera: Coccinellidae), as larvas do bicho lixeiro *Chrysopodes* sp. e *Ceraeochrysa cubana* (Neuroptera: Chrysopidae), bem como adultos e ninfas do percevejo predador *Heza insignis* (Hemiptera: Reduviidae). Contudo, não se sabe se a capacidade de predação é suficiente para conter infestações de *P. praelonga*, uma vez que a presença dos predadores foi registrada apenas quando a infestação já estava avançada (Benvença *et al.*, 2017).

Dentre os fungos promissores para o controle da *P. praelonga*, estão *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Metarhizium anisopliae*, *Akanthomyces lecanii*, *Cladosporium cladosporioides* e *Fusarium* sp., que vêm sendo observados em campo, isolados e estudados quanto ao seu potencial de controle para este e outros insetos (Cesnik *et al.*, 2003; Gravena *et al.*, 2005).

4. Materiais e métodos

4.1 Fungos

Foram utilizados cinco isolados de *Fusarium caatingaense* (URM 6807, URM 6793, URM 6779, URM 6778 e URM 6792), provenientes de adultos da cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae), coletados em diferentes municípios da região semiárida de Pernambuco (Carneiro-Leão *et al.*, 2017). Todos os isolados se encontram depositados na Coleção de Cultura URM (University Recife Mycology) (WFCC N°604), na Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

4.2 Análise dos aspectos biológicos de *Fusarium caatingaense* antes e após o revigoramento em *Nasutitermes corniger*

Os fungos foram avaliados quanto aos seus aspectos biológicos, antes e após o revigoramento no cupim *N. corniger* por meio da análise de microestruturas, germinação, crescimento micelial e produção de conídios.

A análise das microestruturas foi realizada de acordo com a técnica descrita por Domsch *et al.* (2007). As lamínulas foram retiradas após o segundo e sexto dia de inoculação em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e coradas com azul de Amann. A observação das estruturas foi realizada em microscópio óptico.

Para análise da germinação foi utilizado 1mL de suspensão a 1×10^4 conídios/mL de cada isolado sendo inoculados em três placas de Petri com meio BDA e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalsky, sendo mantidos em BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) por 14 horas. Após esse período, o percentual da germinação foi determinado pela contagem de 200 conídios por repetição, verificando-se a quantidade de conídios germinados e não germinados, em microscópio óptico (Alves & Pereira, 1998).

Para análise de crescimento, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Após dez dias de incubação, as colônias foram medidas em diâmetros opostos. A esporulação foi determinada a partir da transferência de três blocos cilíndricos de $0,28 \text{ cm}^2$ das colônias fúngicas para tubos de ensaio contendo 5 mL de Tween 80 (0,01%), agitados em Vórtex por aproximadamente 1 minuto, seguido da contagem de conídios em câmara de Neubauer (Alves & Moraes, 1998).

Quanto à etapa de revigoramento, os fungos foram cultivados em meio BDA e incubados em BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) durante dez dias. Após este período, 1 mL de suspensões de esporos de cada um dos isolados foi preparado e inoculado via pulverização sobre soldados e operários do cupim *N. corniger* (inseto hospedeiro). Em seguida, os insetos foram transferidos com um pincel para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada e um pedaço de papel madeira, que serviu de fonte alimentar, sendo mantidos em ambiente climatizado a $24 \pm 3^\circ\text{C}$ no escuro. Após a morte dos cupins, os fungos foram reisolados e purificados em meio BDA acrescido de Cloranfenicol (0,05%) (Diniz *et al.*, 2020b). Após o revigoramento,

todos os parâmetros biológicos dos isolados foram novamente avaliados, mediante metodologia descrita nos parágrafos anteriores.

4.3 Avaliação da patogenicidade de *Fusarium caatingaense* contra *Praelongorthezia praelonga* *in vitro*

Para o teste de patogenicidade foram selecionados dois isolados de *F. caatingaense* (URM 6778 e URM 6779), que obtiveram melhor resposta após o processo de revigoramento. Esses isolados foram inoculados em três tubos de ensaio contendo meio BDA e incubados em BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) por sete dias. Após esse período, foram preparadas suspensões nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL⁻¹. Os insetos de *P. praelonga* utilizados no ensaio foram coletados em uma aceroleira localizada no estacionamento do Departamento de Micologia, no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). De cada uma das concentrações foi borrifado 1ml sobre ninfas e fêmeas adultas de idade mista. No controle aplicou-se apenas tween 80 (0,01%).

As aplicações foram feitas com o auxílio de um pulverizador manual e os insetos transferidos com auxílio de um pincel para placas de petri esterilizadas, contendo papel filtro umedecido com 1 mL de água destilada esterilizada e duas folhas da aceroleira unidas pelo pecíolo, também esterilizadas. Foram utilizadas dez placas por tratamento, cada placa continha dez insetos, totalizando cem insetos para cada concentração da suspensão e o controle. Ao todo, foram utilizados mil insetos, sendo quinhentos para URM 6779 e os outros quinhentos para URM 6778. A avaliação da mortalidade foi feita a cada dois dias, durante dez dias. Os insetos mortos foram retirados com o auxílio de um pincel e transferidos para uma câmara úmida, contendo papel filtro e 1 mL de água destilada esterilizada.

4.4 Análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (URM 6779, URM 6807, URM 6778, URM 6793 e URM 6792) e três repetições. Os ensaios para a avaliação dos aspectos biológicos dos fungos foram repetidos três vezes, exceto para a análise do microcultivo. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Microsoft Excel, versão 2019, e os resultados apresentados em gráficos de barra com o erro padrão. Diferenças estatísticas foram verificadas utilizando o mesmo programa, para isso os dados foram submetidos ao Teste t pareado como nível de significância de $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Análise dos aspectos biológicos

5.1.1. Microestruturas

Após análise das microestruturas com 48 h e 144 h de crescimento dos cinco isolados de *F. caatingaense* em microscópio óptico antes e após do revigoramento foi constatada a presença de conidióforos, conídios, hifas septadas e em alguns casos foi possível observar a presença de clamidósporos. Nos isolados não revigorados, a presença de clamidósporos foi observada em URM 6779, URM 6807, URM 6793 e URM 6792 em lâminas com dois dias de crescimento e no sexto dia para URM 6778 e URM 6793. Após o revigoramento foi constatada a presença de clamidósporo no segundo dia para URM 6778 e URM 6792 e no sexto dia para URM 6778, URM 6779 e URM 6793 (Tabela 1).

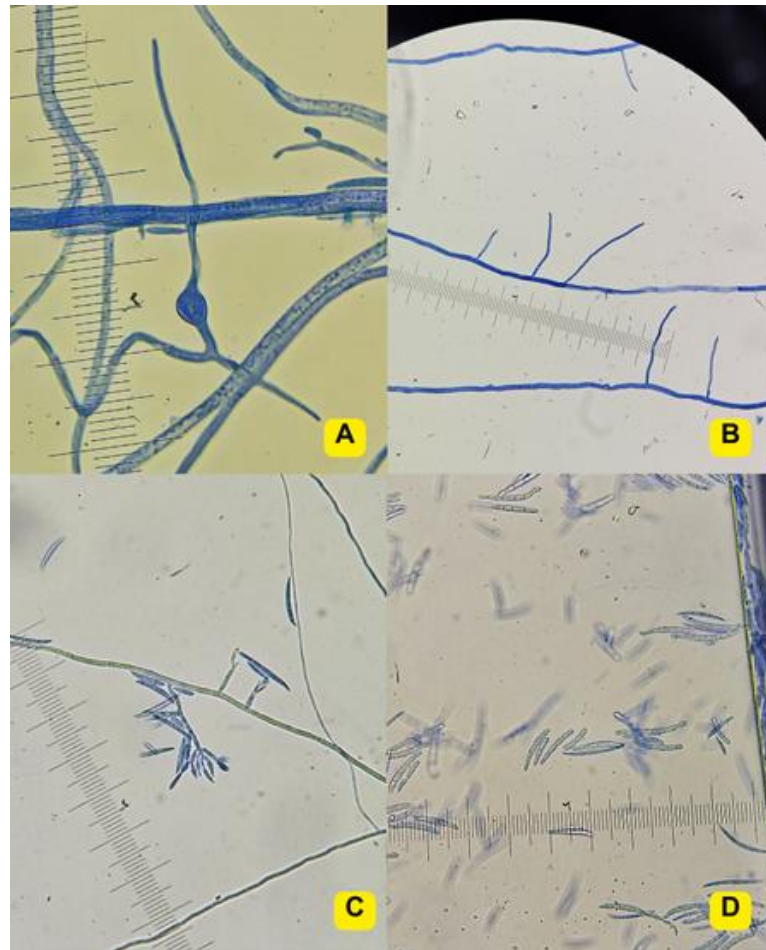
Tabela 1. Presença (+) ou ausência (-) de clamidósporos em isolados de *Fusarium caatingaense* não revigorados (N.R.) e revigorados (R) após o segundo e sexto dia de crescimento.

Clamidósporos				
Isolados	N.R.		R.	
	2º dia	6º dia	2º dia	6º dia
URM 6779	+	-	-	+
URM 6807	+	-	-	-
URM 6778	-	+	+	+
URM 6793	+	+	-	+
URM 6792	+	-	+	-

Fonte: O autor (2024).

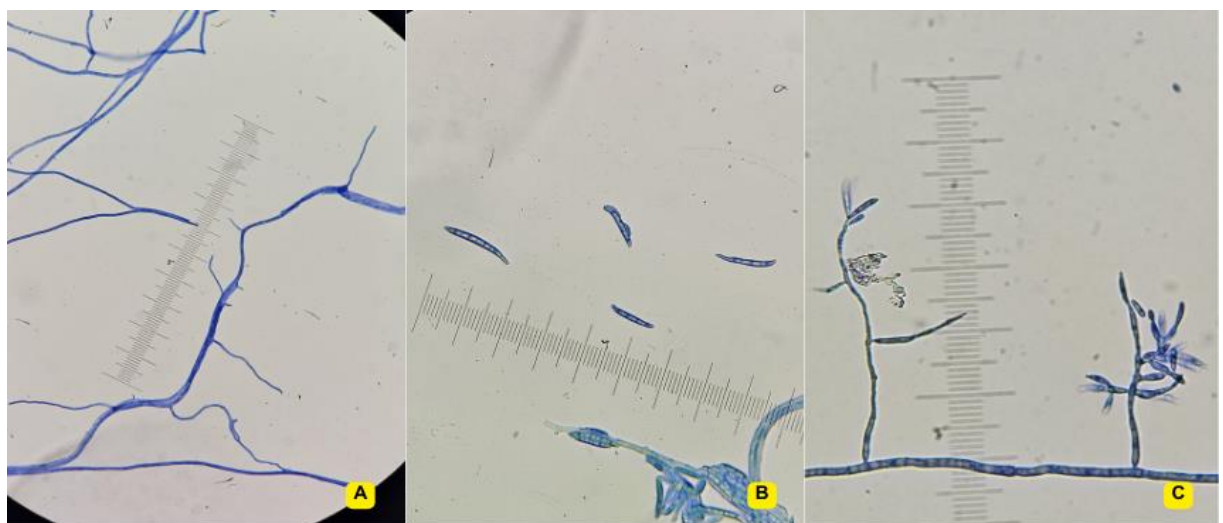
De um modo geral, o sexto dia de crescimento foi o que apresentou uma maior quantidade de estruturas (hifas, conidióforos e conídios) tanto para os isolados revigorados quanto para os não revigorados. Nas Figuras 4 e 5, é possível observar as estruturas encontradas nos diferentes momentos (antes e após o processo de revigoramento).

Figura 4. Microestruturas de *Fusarium caatingaense* após 48h (A, B) e 144h (C, D) de crescimento antes do revigoramento. Em A temos a presença de clamidósporo; em B a presença de conidióforos. Em C e D observa-se a presença de conidióforo com conídios, respectivamente.



Fonte: O autor (2024).

Figure 5. Microestruturas de *Fusarium caatingaense* após 48h (A, B) e 144h (C, D) de crescimento após revigoramento. Em A temos conidióforos em desenvolvimento, B temos a presença de esporos; em C observa-se a presença de conidióforos com conídios.



Fonte: O autor (2024).

Os conidióforos e conídios de *F. caatingaense* foram avaliados quanto a altura e a largura antes e após o revigoramento dos isolados. A altura dos conidióforos nos

isolados não revigorados variou de 17,04–24,64 cm, já a largura variou de 2,63–3,46 cm. Após o revigoramento a variação na altura dos conidióforos foi de 24,42–37,71 cm, enquanto a largura teve uma variação de 2,67–2,92 cm (Tabela 2). De um modo geral, após o revigoramento é possível notar um aumento na média da altura dos conidióforos para todos os isolados estudados.

Tabela 2. Média (média $\pm$ desvio padrão) da altura e largura dos conidióforos dos isolados de *Fusarium caatingaense* não revigorados (N.R.) e revigorados (R.).

Conidióforos				
Isolados	Altura		Largura	
	N.R.	R.	N.R.	R.
URM 6779	19,25 $\pm$ 12,34	28,21 $\pm$ 10,92	3,46 $\pm$ 0,78	2,83 $\pm$ 0,65
URM 6807	24,70 $\pm$ 12,77	28,24 $\pm$ 13,94	2,58 $\pm$ 0,86	2,67 $\pm$ 0,43
URM 6778	17,17 $\pm$ 6,80	25,52 $\pm$ 8,53	3,13 $\pm$ 0,79	3,0 $\pm$ 0,62
URM 6793	20,83 $\pm$ 8,33	37,71 $\pm$ 18,39	3,00 $\pm$ 0,70	3,0 $\pm$ 0,70
URM 6792	19,25 $\pm$ 12,34	24,42 $\pm$ 10,05	2,83 $\pm$ 0,73	2,92 $\pm$ 0,68

Fonte: O autor (2024).

Em relação aos conídios, os isolados não revigorados apresentaram uma variação na altura de 17,96–23,38 cm, enquanto para os revigorados foi de 19,54–22,46 cm. Em relação a largura dos conídios, para os isolados não revigorados foi de 2,79–3,88 cm e para os revigorados foi 2,75–3,23 cm (Tabela 3).

Tabela 3. Média (média $\pm$ desvio padrão) da altura e largura dos conídios dos isolados de *Fusarium caatingaense* não revigorados (N.R.) e revigorados (R.).

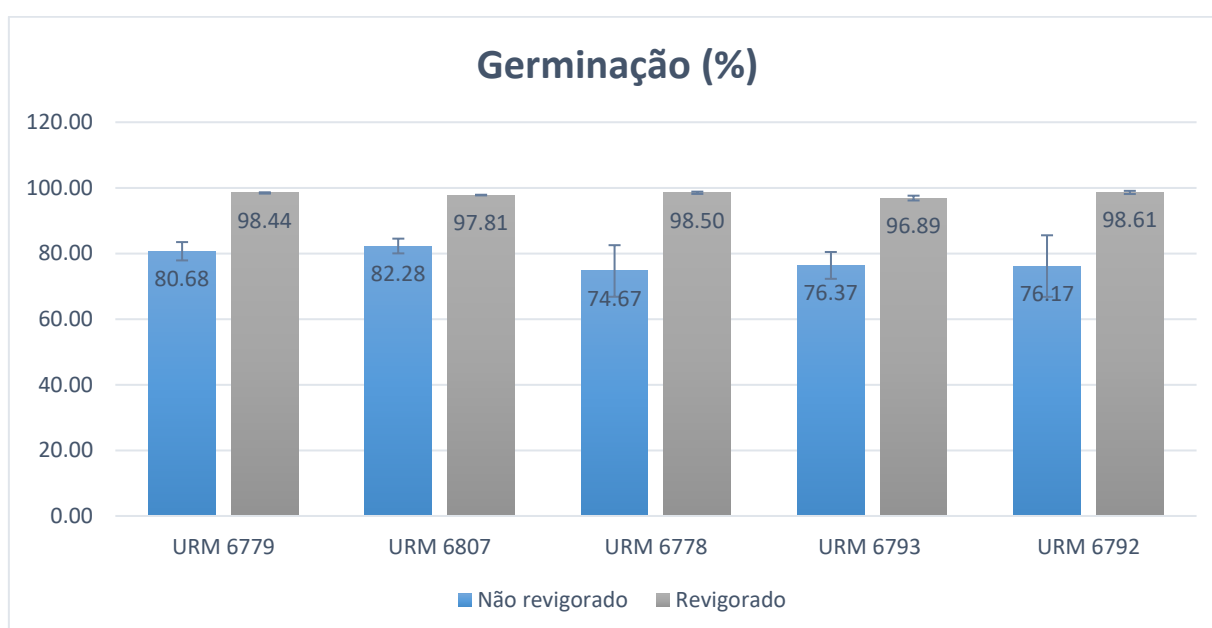
Conídios				
Isolados	Altura		Largura	
	N.R.	R.	N.R.	R.
URM 6779	20,21 $\pm$ 3,69	21,38 $\pm$ 5,49	3,79 $\pm$ 0,77	2,96 $\pm$ 0,70
URM 6807	19,13 $\pm$ 5,04	22,46 $\pm$ 3,99	2,79 $\pm$ 0,78	2,71 $\pm$ 0,47
URM 6778	19,04 $\pm$ 4,16	19,54 $\pm$ 4,87	3,88 $\pm$ 0,68	3,08 $\pm$ 0,63
URM 6793	23,38 $\pm$ 4,29	21,54 $\pm$ 4,33	4,23 $\pm$ 0,87	3,04 $\pm$ 0,63
URM 6792	17,96 $\pm$ 2,89	21,54 $\pm$ 3,72	2,92 $\pm$ 0,95	3,25 $\pm$ 0,70

Fonte: O autor (2024).

5.1.2 Germinação

De acordo com o Test t pareado após análise da germinação foi observado uma mudança significativa em relação aos isolados não revigorados em comparação aos revigorados, com $p = 0,0001$. A germinação variou de 76,17%-82,28% para os isolados não revigorados. Entretanto, após passagem pelo cupim *N. corniger*, os isolados sofreram um aumento na taxa germinativa dos esporos, com viabilidade variando de 96,89%-98,61% (Figura 6).

Figura 6. Germinação dos conídios de *Fusarium caatingaense* antes e após o revigoramento no cupim *Nasutitermes corniger*.

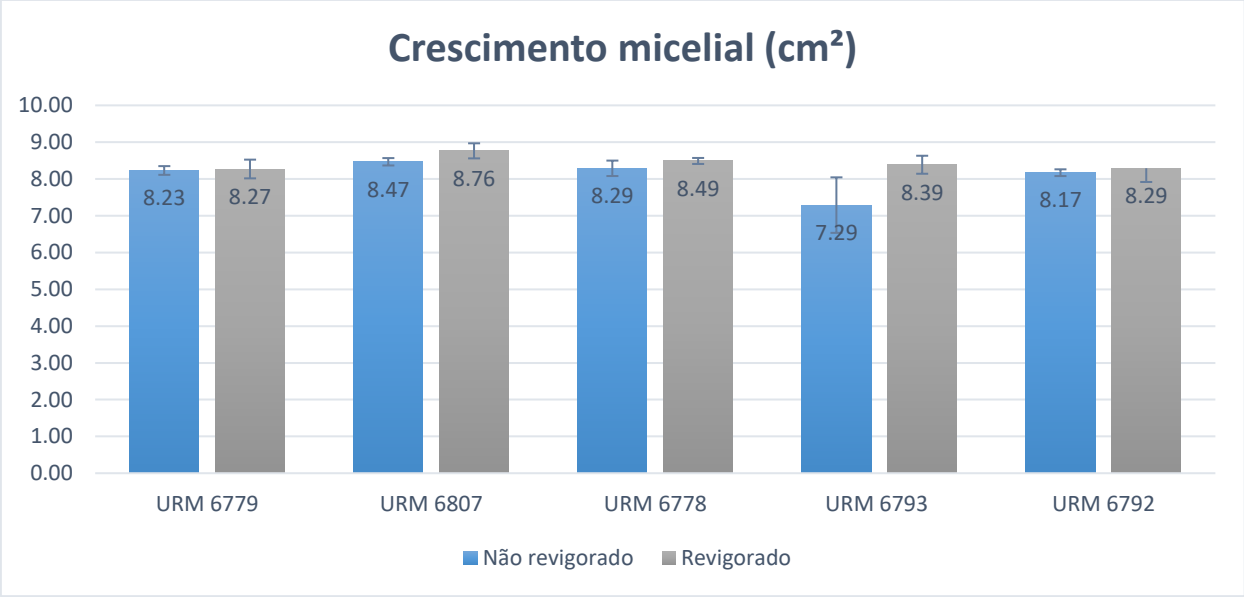


Fonte: O autor (2024).

5.1.3. Crescimento micelial

Para o crescimento micelial não houve mudanças significativas quando comparados os isolados antes e após o revigoramento, com $p = 0,14$. O crescimento das colônias fúngicas foi semelhante em ambos os momentos de avaliação. Entretanto, o isolado URM 6793 em relação aos demais, apresentou um leve acréscimo no crescimento micelial (Figura 7) e (Figura 8 G e H).

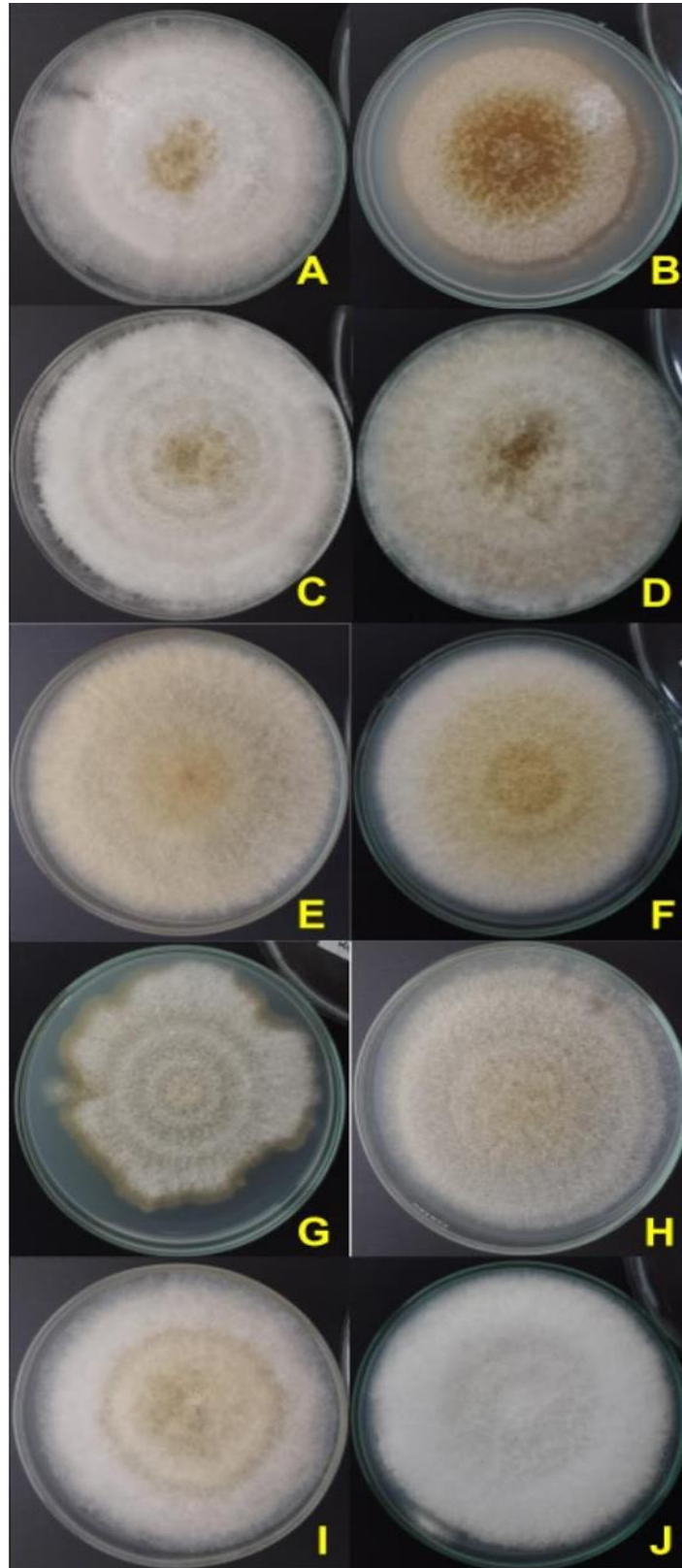
Figura 7. Crescimento micelial de isolados de *Fusarium caatingaense*, antes e após o revigoramento no cupim *Nasutitermes corniger*.



Fonte: O autor (2024).

Na figura 8 podemos observar as placas referentes ao crescimento micelial dos isolados de *F. caatingaense* antes e após revigoramento. É possível notar que alguns isolados que passaram pelo revigoramento (B, D e F) adquiriram uma coloração levemente rosácea e amarronzada, tanto no centro da placa, quanto nas extremidades em comparação com os mesmos isolados não revigorados (A, C, E). O isolado URM 6792 (J) apresentou uma coloração esbranquiçada após seu revigoramento.

Figura 8. Verso das placas de petri com meio BDA mostrando o crescimento micelial com dez dias de inoculação antes (A, C, E, G, I) e após (B, D, F, H, J) revigoramento dos isolados de URM 6779 (A, B), URM 6807 (C, D), URM 6778 (E, F), URM 6793 (G, H) e URM 6792 (I, J).

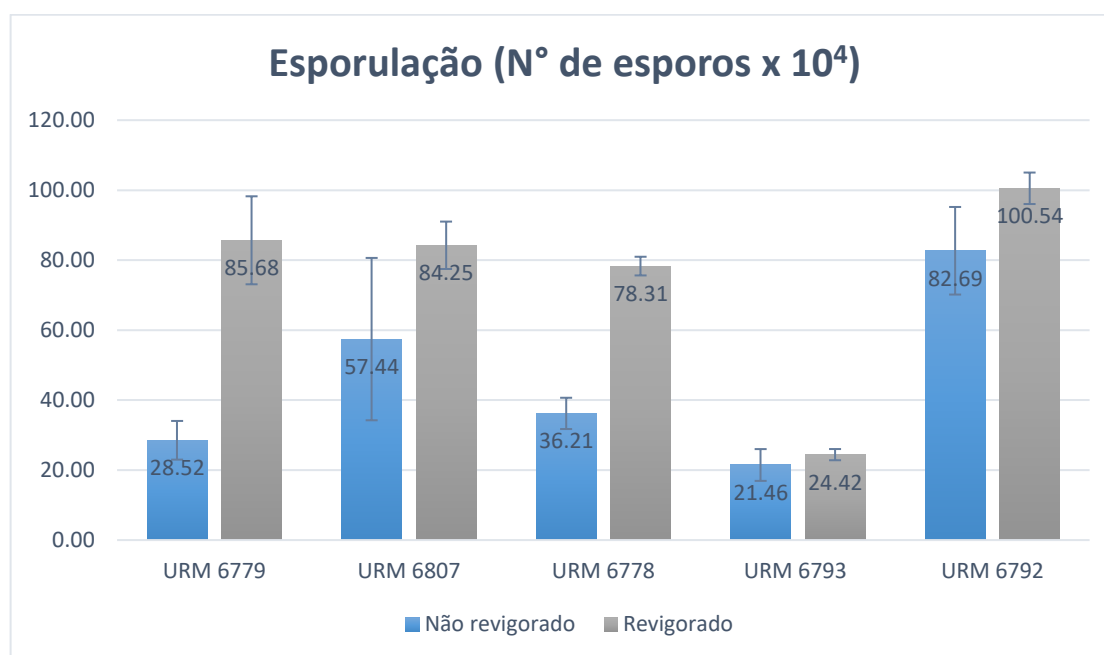


Fonte: O autor (2024).

5.1.4. Esporulação

Após avaliação da esporulação notou-se um aumento significativo no número de esporos produzidos pela maioria dos isolados com base no Teste t pareado, com $p = 0,03$. O isolado com a maior taxa de esporulação após revigoramento foi o URM 6792, que antes do revigoramento esporulou $82,69 \times 10^4$ conídios/ml e após apresentou esporulação de $100,54 \times 10^4$ conídios/ml (Figura 9). Uma melhora significativa na esporulação também foi observada após o revigoramento dos isolados URM 6778 e URM 6779. Os valores de esporulação, que eram de $36,21 \times 10^4$ conídios/ml e $28,52 \times 10^4$ conídios/ml, aumentaram para $78,31 \times 10^4$ conídios/ml e $85,68 \times 10^4$ conídios/ml, respectivamente. O isolado URM 6793 antes do revigoramento apresentou esporulação de $21,46 \times 10^4$ conídios/ml e após o revigoramento $24,42 \times 10^4$ conídios/ml, havendo pouca melhora na esporulação para esse isolado.

Figura 9. Esporulação de *Fusarium caatingaense* antes e após o revigoramento no cupim *Nasutitermes corniger*.



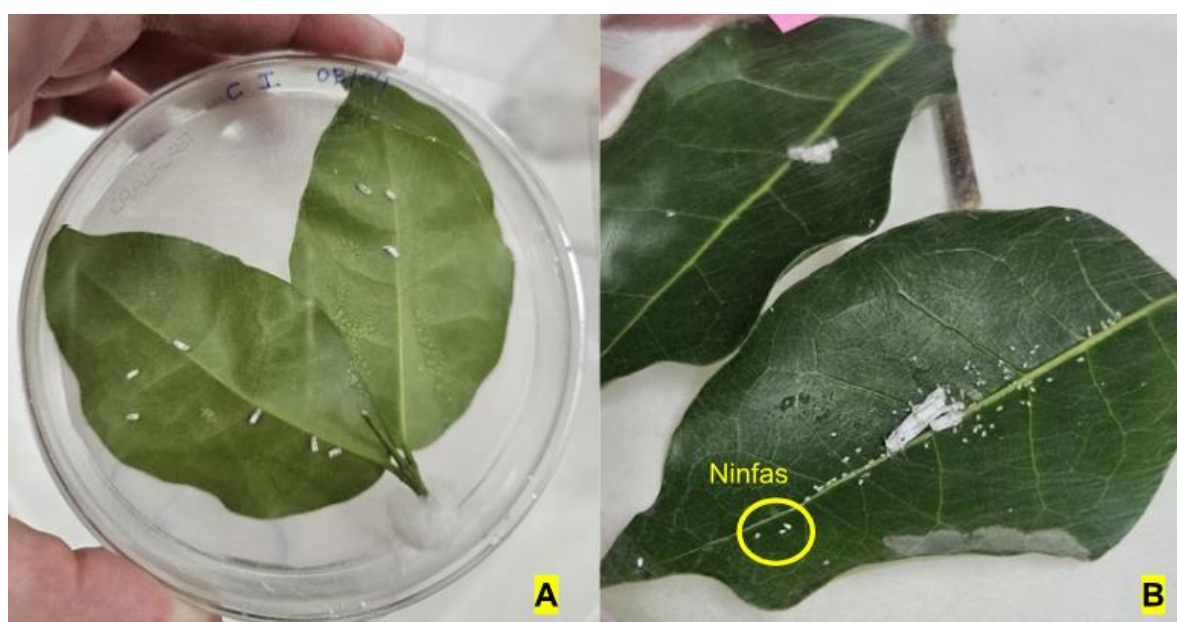
Fonte: O autor (2024).

5.2. Testes de patogenicidade de *Fusarium caatingaense* contra *Praelongorthezia praelonga*

Para o teste de patogenicidade foram selecionados dois isolados de *F. caatingaense* (URM 6778 e URM 6779). Ambos isolados se destacaram na maioria dos parâmetros avaliados, com melhora significativa na esporulação e germinação.

Embora fosse esperado um resultado positivo para o controle da *P. praelonga*, no decorrer do experimento, notou-se um aumento do número de indivíduos nas placas (Figura 10). A mortalidade observada nos tratamentos foi igual ao controle, com confirmada de 0% para ambos os isolados testados. Na Figura 10, é possível observar ninfas a mais na placa poucos dias depois da montagem (Figura 10B), em relação à placa no dia da montagem do experimento (Figura 10A), indicando que o inseto estava se reproduzindo.

Figura 10. Placa de petri com papel filtro e folha de acerola com o inseto *Praelongorthezia praelonga* no dia da montagem do experimento (A) e após cinco dias com surgimento de novas ninfas (B).



Fonte: O autor (2024).

Em diversas placas e em dias diferentes foi possível notar a mudança de estágio das ninfas, tendo alguns desses insetos sofridos a ecdise. Ao fim da avaliação, no 8º dia, constatou-se que *F. caatingaense* nas condições em que foi testado não foi patogênico a *P. praelonga*, visto que a mortalidade observada para URM 6778 e URM 6779 foi igual à do controle, em que praticamente todos os insetos permaneceram vivos.

6. Discussão

Baseado nos dados obtidos da avaliação dos parâmetros biológicos foi possível observar uma melhora nos cinco isolados de *F. caatingaense* após o revigoramento no cupim arborícola *N. corniger*. Taxas de germinação semelhantes foram observadas por Diniz *et al.* (2024), que ao realizarem o revigoramento de URM 6778 e URM 6779

em *N. corniger*, relataram viabilidade de 92,16% e 95,17%, respectivamente. Valores de germinação acima de 90% demonstram que o fungo está viável e que pode ser utilizado em estudos de controle biológico (Alves, 1998). A germinação é um fator decisivo no controle microbiano uma vez que a alta taxa de esporos germinados contribui para a virulência das linhagens fúngicas. Outro parâmetro essencial é a taxa de esporulação do fungo, uma vez que os esporos são responsáveis pela propagação do mesmo no ambiente. De acordo com Almeida *et al.* (2005), fungos que produzem grandes quantidades de esporos podem se apresentar mais virulentos, sendo considerados boas opções para controle de insetos-pragas.

Outros trabalhos também avaliaram parâmetros biológicos de fungos entomopatogênicos após o seu revigoramento. Semelhante ao observado aqui, Lopes *et al.* (2016) não demonstraram mudanças nos aspectos morfológicos dos fungos *Isaria farinosa*, *Isaria fumosorosea* e *Isaria javanica* após o revigoramento em *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Entretanto, os autores mostraram melhoras na germinação e esporulação dos fungos, indicando que estes estavam aptos para uso em bioensaios. O estudo realizado por Bezerra (2018), demonstrou uma melhor taxa de virulência para *M. anisopliae* após passagem no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Outro estudo que corrobora com os dados dessa pesquisa foi o realizado por Feijó *et al.* (2009), onde os aspectos de virulência de *M. anisopliae* e *M. flavoviride* obtiveram melhoras quando submetidos ao revigoramento em ovos, larvas e adultos de *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae).

Esses resultados reforçam a importância do revigoramento de fungos entomopatogênicos, principalmente antes da realização de testes de patogenicidade. O revigoramento deve ser feito de preferência em um inseto ao qual o fungo seja patogênico. Apesar dos aspectos morfológicos não terem apresentados grandes mudanças, e nem o crescimento micelial ter diferido após o revigoramento, a germinação e a esporulação de *F. caatingaense* obtiveram melhoras significativas. Tais observações, demonstram que o cupim arborícola *N. corniger* é uma excelente opção para o revigoramento de *F. caatingaense*. Em um estudo semelhante Lopes *et al.* (2008) demonstram que o cupim *Coptotermes gestroi* (wassmann) (Isoptera: Rhinotermitidae) pode ser utilizado como opção para o revigoramento de *C. farinosa* (= *P. farinosus*). Os autores observaram o aumento no número de conidióforos e

conídios produzidos pelo fungo, bem como apressórios em maior proporção. O isolado URM 4995 apresentou crescimento micelial maior em comparação ao observado antes do revigoreamento. Essa mesma espécie de cupim, influenciou positivamente os parâmetros biológicos de *Cordyceps javanica* (= *I. javanica*), sendo considerado um inseto hospedeiro interessante para o revigoreamento desse fungo (Lopes *et al.*, 2011).

Em relação a avaliação da patogenicidade contra *P. praelonga*, observamos um resultado negativo. *F. caatingaense* não é patogênico a este inseto. Contudo, essa mesma espécie de fungo é patogênica a cochonilha *D. opuntiae*, apresentado resultados promissores em ensaios de laboratório, casa de vegetação e campo (Velez *et al.*, 2019; Diniz *et al.* 2020a e Diniz *et al.* 2024). Outros estudos realizados contra insetos Hemiptera, por espécies de *Fusarium* pertencentes ao Complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), demonstraram resultados satisfatórios no controle de *Matsucoccus matsumurae* Kuwana (Hemiptera: Coccoidea: Matsucoccidae), (Liu *et al.*, 2014), *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (Anwar *et al.*, 2017), *Coccus hesperidum* L. (Hemiptera: Coccidae) (Fan *et al.*, 2014).

A não patogenicidade de *F. caatingaense* a *P. praelonga* pode estar associada a fatores intrínsecos e externos que possivelmente comprometeram a virulência dos isolados, afetando o mecanismo de ação do fungo (Maina *et al.*, 2018). Esses fatores incluem o mecanismo de defesa do inseto, que pode interferir na infecção fúngica, mesmo após a entrada do fungo no corpo do inseto. Características da cutícula do inseto, como espessura, esclerotização e a presença de substâncias antifúngicas e nutricionais (Charnley, 2003), podem ter dificultado a ação dos isolados contra *P. praelonga* (Pal *et al.* 2007; Mora *et al.* 2018).

Investigações do potencial de espécies de *Fusarium* obtidas de insetos para possíveis aplicações no controle de insetos são necessárias. Como visto, *F. caatingaense* é um excelente agente de controle da cochonilha do carmim. Entretanto, nesse estudo, a não patogenicidade dessa espécie foi observada para a cochonilha *P. praelonga*, demonstrando que *F. caatingaense* apresenta especificidade a certos hospedeiros. Em um outro estudo, *F. caatingaense* também apresentou mortalidade de 0% após testes *in vitro* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Diniz *et al.*, 2020b). Essa é uma observação importante, uma vez que a especificidade de fungos entomopatogênicos ao hospedeiro é considerada uma característica

vantajosa, diminuindo o impacto a organismos não-alvo. Essa característica, confere ao fungo uma maior segurança ambiental, otimizando a supressão da praga com uma menor possibilidade de resistência.

7. Conclusão

Apesar dos aspectos morfológicos e do crescimento não terem tido grandes alterações, houve uma melhora nos demais parâmetros. As taxas de germinação foram superiores a 90% e a esporulação dos fungos apresentaram melhora significativa, principalmente para os isolados URM 6778 e URM 6779, que foram selecionados para o teste de patogenicidade e virulência contra *P. praelonga*. De um modo geral a melhora observada nos parâmetros biológicos demonstra a importância do revigoramento de fungos entomopatogênicos, principalmente antes da realização de testes de patogenicidade. Os isolados URM 6779 e URM 6778 não são patogênicos a *P. praelonga*. Esse resultado indica que *F. caatingaense* apresenta especificidade a hospedeiros, o que é visto como uma característica positiva para o controle biológico.

8. Referências

- ABD-ELGAWAD, M. M. Towards optimization of entomopathogenic nematodes for more service in the biological control of insect pests. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 1, p. 1-8, 2019.
- ALMEIDA, J. C.; Albuquerque, A. C.; Lima, E. A. Viabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) artificialmente infectado. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 473-480, 2005.
- ALMEIDA, L. F. V. Estudo diagnóstico e taxonômico de cochonilhas (Hemiptera: Coccoidea) associadas às plantas cítricas no estado de São Paulo, Brasil. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 76f. 2016.
- ALVES, S. B.; Morais, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B.; MORAIS, S. A. Controle microbiano de insetos. **Piracicaba: FEALQ**, p. 765-777. 1998.
- ALVES, S. B.; Pereira, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Controle microbiano de insetos. **Piracicaba: FEALQ**. p. 845-867. 1998.
- ANWAR, W.; Haider, M. S.; Shahid, A. A.; Mushtaq, H.; Hameed, U.; Rehman, M. Z. U.; Iqbal, M. J. Genetic diversity of *Fusarium* isolated from members of Sternorrhyncha (Hemiptera): Entomopathogens against *Bemisia tabaci*. **Pakistan Journal of Zoology**, 49(2). 2017.
- AOKI, T.; Kasson, M. T.; Berger, M. C.; Freeman, S.; Geiser, D. M.; O'Donnell, K. *Fusarium oligoseptatum* sp. nov., a mycosymbiont of the ambrosia beetle *Euwallacea validus* in the Eastern US and typification of *F. ambrosium*. **FUSE**, v. 1, p. 23-39, 2018.
- AOKI, T.; Smith, J. A.; Kasson, M. T.; Freeman, S.; Geiser, D. M.; Geering, A. D.; O'Donnell, K. Three novel Ambrosia *Fusarium* Clade species producing clavate macroconidia known (*F. floridanum* and *F. obliquiseptatum*) or predicted (*F. tuaranense*) to be farmed by *Euwallacea* spp. (Coleoptera: Scolytinae) on woody hosts. **Mycologia**, p. 1-17, 2019.

BAKER, B. P.; Green, T. A.; Loker, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020.

BARBOSA, F. R.; Gonzaga, L. N.; Carvalho, G. D. L.; Carvalho, R. D. S. Manejo e controle da Cochonilha Ortézia (*Orthezia praelonga*) em plantios irrigados de acerola no Submédio São Francisco. **Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica**. 2007.

BENVENGA, S. R.; Gravena, S.; Silva, J. L.; Junior, N. A.; Amorim, L. C. S. Manejo prático da cochonilha ortézia em pomares de citros. **Citrus Research & Technology**, 32(1), 39-52. 2017.

BEZERRA, N. S. Eficiência de fungos entomopatogênicos sobre formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae). **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, João Pessoa, Paraíba**. 2018.

BIHAL, R.; Al-Khayri, J.M.; Banu, A.N.; Kudesia, N.; Ahmed, F.K.; Sarkar, R.; Arora, A.; Abd-Elsalam, K.A. Entomopathogenic Fungi: An Eco-Friendly Synthesis of Sustainable Nanoparticles and Their Nanopesticide Properties. **Microorganisms**. 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061617>

BORGIO, J. F.; Sahayaraj, K.; Alpersusurluk, I. Microbial insecticides: principles and applications. In: (Chapter 1), Cafer Eken, ISOLATION, IDENTIFICATION AND PRESERVATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI. **Hauppauge, NY: Nova Publishers**, 2012.

BRASIL. Mapa alcança 60 especificações de referência para o controle de pragas. **AGROTÓXICOS**, 2024. Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-alcanca-60-especificacoes-de-referencia-para-o-controle-de-pragas-1>. Acesso em: 06 set. 2024.

BRASIL. Mapa encerra 2023 com 90 produtos de baixo impacto registrados. **AGROTÓXICOS**, 29 dez. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-encerra-2023-com-90-produtos-de-baixo-impacto-registrados>. Acesso em: 05 set. 2024.

BRECHELT, A. Manejo Ecológico de Pragas e Doenças. Santiago: Rede de Ação em Praguicidas e suas Alternativas para a América Latina (RAP-AL), 1ª Ed., p.33, 2004.

CANHOS, V.P. et al. Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP – Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA**. 2004.

CARNEIRO-LEÃO, M.P.; Tiago, P.V.; Medeiros, L.V.; Costa, A.F.; Oliveira, N.T. *Dactylopius opuntiae*: control by the *Fusarium incarnatum–equiseti* species complex and confirmation of mortality by DNA fingerprinting. **Journal of Pest Science**. 90: 925-933. 2017.

CAVALCANTI, S. D. B. Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **Dissertação (Mestrado) - Programa de Dermatologia, Faculdade de Medicina de São Paulo**. São Paulo. 74p. 2010.

CESNIK, R.; Prates, H. S.; Alves, S. B. Controle biológico de *Orthezia praelonga* na citricultura. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**. Np. 1 Folder. 2003.

CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, 40:241–321, 2003.

COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL (Cati). Recomendações para o controle das principais pragas e doenças em pomares do Estado de São Paulo. 5.ed. Campinas, 1997. 58p. (CATI. Boletim Técnico, 165).

COSTA, A. F.; Lopes, R. S.; Diniz, A. G.; Ribeiro, T. K. O.; Santos, A. C. S.; Tiago, P. V.; Oliveira, L. G. Controle alternativo e biológico de pragas e fitopatógenos: uma década de contribuição. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 27, n. 2, 2022.

COSTA, C. P.; Ferreira, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**. v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E.C.; Oliveira, A.P. de; Feistel, J.C.; Rezendeal, C.S.M.e. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**. v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

COSTA, L. de P.; Mota, M. E. B.; Cardoso, A. M. Experimentação de diferentes métodos para conservação de coletâneas fúngicas. **REVISTA BRASILEIRA MILITAR DE CIÊNCIAS**, [S. l.], v. 6, n. 16, 2020. DOI: 10.36414/rbmc.v6i16.62.

DARA, S. K. Non-entomopathogenic roles of entomopathogenic fungi in promoting plant health and growth. **Insects**, v. 10, n. 9, p. 277, 2019.

DELGADO, P. A. M.; Murcia, O. P. Hongos entomopatógenos: uma alternativa para la obtención de biopesticidas. **Ambi-Agua**, v. 6, p. 77-90, 2011.

DELLARETTI, E. M. Preservação de fungos em baixas temperaturas. **Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas)**, 2014.

DIEGO-NAVA, F.; Granados-Echegoyen, C.; Ruíz-Veja, J.; Aquino-Bolaños, T.; Pérez-Pacheco, R.; Díaz-Ramos, A.; Alonso-Hernández, N.; Arroyo-Balán, F.; López-Hernández, M. B. Functional and Quality Assessment of a Spore Harvester for Entomopathogenic Fungi for Biopesticide Production. **AgriEngineering**. 5(2):801-813. 2023. <https://doi.org/10.3390/agriengineering5020049>

DINIZ, A. G.; Barbosa, L. F. S.; Santos, A. C. S.; Oliveira, N. T.; Costa, A. F.; Carneiro-Leão, M. P.; Tiago, P. V. Bio-insecticide effect of isolates of *Fusarium caatingaense* (Sordariomycetes: Hypocreales) combined to botanical extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae), **Biocontrol Science and Technology**, 2020a. DOI: 10.1080/09583157.2020.1720601

DINIZ, A. G.; Cerqueira, L. V. B. M. P. D.; Ribeiro, T. K. D. O.; Costa, A. F.; Tiago, P. V. Pathogenicity of isolates of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex to *Nasutitermes corniger* (Blattodea: Termitidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Pest Management**, 1-10. 2020b.

DINIZ, A. G.; Grasse, R. F.; Carneiro-Leão, M. P.; Oliveira, A. F. M.; Silva, A. P. de A. P.; Costa, A. F.; Tiago, P. V. Efficacy of *Fusarium caatingaense* and botanical extracts in controlling *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in the field. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. e6256, 2024. DOI: 10.55905/oelv22n8-107.

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. **San Francisco: Editora IHW-Verlag**, 672 p. 2007.

ELKHATEEB, W. A.; Mousa, K. M.; ELnahas, M. O.; Daba, G. M. Fungi against insects and contrariwise as biological control models. **Egypt J Biol Pest Control** 31, 13. 2021. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00360-8>

FAN, J. H.; Xie, Y. P.; Xue, J. L.; Xiong, Q.; Jiang, W. J.; Zhang, Y. J.; Ren, Z. M. The strain HEB01 of *Fusarium* sp., a new pathogen that infects brown soft scale. **Annals of microbiology**, 64(1), 333-341. 2014.

FAO. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. **Roma: Dirección de producción y sanidad animal de la FAO**, p. 33-35. 2003.

FEIJÓ, F. M. C.; Lima, P. M.; Melo, E. H. M. Athayde, A. C. R.; Lima, E. Á. L. Behavior and cytological aspects of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* after passage in *Chrysomya albiceps*. **Revista Caatinga, Mossoró**. v. 22, n. 2, p. 39-44. 2009.

FONTES, E. M. G.; Valadares-Inglis, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. 1ª ed. **Brasília, DF: Embrapa**. 510 p. ISBN 978-65-86056-01-3. 2020.

GARCIA, M. M.; Denno, B. D.; Miller, D. R.; Miller, G. L.; Ben-dov, Y.; Hardy, N. B. ScaleNet: a literature-based model of scale insect biology and systematics. **Database**, bav118. 2016.

GARCIA-ROA, F. A. Management of *Orthezia praelonga*, A Citrus Pest - Manejo de *Orthezia praelonga*, una Plaga de los Cítricos. **CO-BAC, Santafé de Bogotá**, Bogotá, Colombia (in Spanish). 1995.

GRAVENA, S.; Gravena, R.; Gravena, A. R.; Benvenga, S. R.; Silva, J. L.; Amorim, L. C. de S.; Araujo Júnior, N de. As pragas. In: Gravena, S. (Ed.). **Manual prático de manejo ecológico de pragas de citros**. Jaboticabal: Gravena, cap. 2, p. 69-219. 2005.

GUIRADO, N.; Sakai, E.; Ambrosano, E.J. Avaliação de efeito do óleo de nim extraído de sementes de *Azadirachta indica* no controle da cochonilha ortézia em laranja 'Pêra'. **Revista de Agricultura**, v.76, p.401-409, 2001.

HUMBER, R. A. Fungi: preservation of cultures. In **Manual of techniques in insect pathology**, Academic Press. p. 269-279. 1997.

ISLAM, W.; Adnan, M.; Shabbir, A.; Naveed, H.; Abubakar, Y. S.; Qasim, M.; Tayyab, M.; Nonam, A.; Nisar, M. S.; Khan, K. A.; Ali, H. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, 105122. ISSN 0882-4010. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>.

JABER, L. R.; Enkerli J. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? **Biocontrol Sci Technol** 27:28–41. 2017.

KIDANU S., Hagos L. Entomopathogenic Fungi as a Biological Pest Management Option: A Review. **International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences (IJRSAS)**, v. 6, n. 6, p. 1-10. 2020. ISSN (Online) 2454–6224. DOI: <http://dx.doi.org/10.20431/2454-6224.0606001>.

KONDO, T.; Peronti, A.L.; Kozar, F.; Szita, E. The citrus orthezia, *Praelongorthezia praelonga*, a potential invasive species. In: Pena, J. (Ed.), Potential Invasive Pests of Agricultural Crops), Chapter 17. **CAB International, UK**, pp. 301e320. 2013.

Kondo, T. (2022). Family: Ortheziidae. In T. Kondo & G. W. Watson (Eds.), *Encyclopedia of Scale Insect Pests* (pp. 53–60). **CABI**. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781800620643.0003b>

LAHLALI, R.; Said, E.; Radouane, N.; Kenfaoui, J.; Esmaeel, Q.; El Hamss, H.; Belabess, Z.; Barka. E. A. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. **Microorganisms** 10, no. 3: 596. 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>

LESLIE, J. F.; Summerell, B. A. The Fusarium Laboratory Manual. **Blackwell Professional, Ames, Iowa**. p.388. 2006.

LI, Z.; Alves, S. B.; Roberts, D. W.; Fan, M.; Delalibera, I.; Tang, J.; Lopes, R. B; Faria, M.; Rangel, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, 20(2), 117–136. 2010. doi:10.1080/09583150903431665

LIU, Y. C.; Ni, N. T.; Chang, J. C.; Li, Y. H.; Lee, M. R.; Kim, J. S.; Nai, Y. S. Isolation and selection of entomopathogenic fungi from soil samples and evaluation of fungal virulence against insect pests. **Journal of Visualized Experiments**, n. 175, e62882, 2021. doi:10.3791/62882.

LOPES R. S.; Lima, G.; Oliveira, L. G.; Costa, A. F.; Santos Correia, M. T.; Luna Alves Lima, E. Á.; Lima, V. L. M. Aspectos biológicos de espécies de *Isaria* (Persoon) após infecção sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, 21(1), 32-38. 2016.

LOPES, R. S.; Portela, A. P. A. S.; Svedese, V. M.; Albuquerque, A. C.; Lima, E. L. A. Aspectos morfológicos de *Paecilomyces farinosus* (Holmex sf Gray) Brown & Smith sobre infecção em *Coptotermes gestroi* (Wasmann)(Isoptera: Rhinotermitidae). **O Biológico**, 70(1), 29-33. 2008.

LOPES, R.; Svedese, V.; Silva, A.; Albuquerque, A.; Luna-Alves, L. I. M. A.; Ea, V. Aspectos biológicos de *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones sobre *Coptotermes gestroi* (Wasmann)(Isoptera: Rhinotermitidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 78(4), 565-572. 2011.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; Jansson, H. B. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. **Cuadernos de biodiversidad**, nº 6, pp. 12-15. 2001.

MAINA, U.M.; Galadima, I.B.; Gambo, F.M.; Zakaria, D. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 6(1): 27-32. 2018.

MANTZOUKAS, S.; Kitsiou, F.; Natsiopoulos, D.; Eliopoulos, P. A. Entomopathogenic fungi: interactions and applications. **Encyclopedia**, v. 2, n. 2, p. 646-656, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044>.

MARQUES, E. D. J. M.; Alves, S. B.; Marques, I. M. R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Controle Biológico, Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 1-12, jun. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000200012>.

MILLER, D. R.; Miller, G. L.; Hodges, G. S.; Davidson, J. A. Introduced scale insect (Hemiptera: Coccoidea) of the United States and their impact on U.S. agriculture. **Proceedings of Entomological Society of Washington**, v.107, p.123-158, 2005.

MOHANTY, S. S.; Raghavendra, K.; Rai, U.; Dash, A. P. Efficacy of female *Culex quinquefasciatus* with entomopathogenic fungus *Fusarium pallidroseum*. **Parasitology Research**, 103:171-174. 2008.

MORA M.; Castilho, A. M. C.; Fraga, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arq Inst Biol**. 84:1–10. 2017.

MORAES, S. C. S. A avaliação de patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em formigas do gênero *Atta* spp. utilizando aprendizado de máquina. **[Dissertação de Mestrado] – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Patos de Minas – MG. 2022.**

MORGAN, C. A.; Herman, N.; White, P. A.; Vesey, G. Preservation of micro-organisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>

MUNSHI, N. A.; Hussain, B.; Malik, G. N.; Yousuf, M.; Fatima, N. Efficacy of Entomopathogenic Fungus *Fusarium pallidroseum* (Cooke) Sacc. Against Gypsy Moth (*Lymantria obfuscate* Walker). **Journal of Entomology**, 5: 59-61. 2008.

MURRAY, P. R.; Barone, E. J.; Jorgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; Tenover, R. C. Manual of clinical microbiology. 8 ed., **ASM Press, Washington DC**, 2113p. 2003.

NAKASONE, K. K.; Peterson, A. W.; Jong, S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (Ed.). **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods. San Diego: Elsevier Academic**, p. 37-47, 2004.

NAKASONE, K. K.; Peterson, S. W.; Jong, S. Preservation and distribution of fungal cultures. **Biodiversity of fungi**, p. 37-47, 2004.

NEUFELD, P. M.; Oliveira, P. C. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**. v. 40, n. 3, p. 167-169, 2008.

NEVES, A. D.; Haddad, M. D. L.; Zério, N. G.; Parra, J. R. P. Exigências térmicas e estimativas do número de gerações de ortézia dos citros criadas em limão-cravo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45, 791-796. 2010.

OLIVEIRA, C.H. Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais**. 87 p. 2007.

OLIVEIRA, I.; Pereira, J. A.; Bento, A.; Baptista, P. Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 339–344, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0147-8>.

PAL, S., St. Leger RJ, Wu, L. P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, 282(12):8969–8977. 2007.

PANYASIRI, C.; Attathom, T.; Poehling, H. M. Pathogenicity of entomopathogenic fungi-potential candidates to control insect pests on tomato under protected cultivation in Thailand. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 114: 278-287. 2007.

PARRA, J. R. P. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. **Editora Manole**, 2002.

PARRA, J. R. P.; Oliveira, H. N.; Pinto, A. S. Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos dos citros. **Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brasil**. 150 p. 2005.

PAVA-RIPOLL, M.; Angelini, C.; Fang, W.; Wang, S.; Posada, F. J.; St Leger, R. The rhizosphere competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology** 157:47–55. 2011.

PELIZZA, S. A.; Stenglein, S. A.; Cabello, M. N.; Dinolfo, M. I.; Lange, C. E. First record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. **Journal of insect Science**, 11(1), 70. 2011.

PRAJAPATI, D. R.; Patel, N. B.; Gohel, N. M. A review on entomopathogenic facet of *Fusarium verticillioides*. **Environment and Ecology**, v. 41, n. 4, p. 2365-2374, 2023. DOI: <https://doi.org/10.60151/envec/FYZN6327>. ISSN 0970-0420.

PUTRI, N. S.; Kim, J. S. Industrial attractiveness of entomopathogenic *Fusarium* as biopesticide against melon thrips, *Thrips palmi*. **Entomological Research**, v. 54, e12721, 2024. doi: 10.1111/1748-5967.12721.

RHODES, M.E. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**. v. 20, n. 1, p.108–118, 1957. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1957.tb04527.x>

RIBEIRO, T. K. O. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de cupim e insetos-praga do feijão-caupi. **Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Micologia, Recife**. 2020.

RIGOBELLO, E. C. Organismos do solo. **Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV)**. Disponível em <<https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/producaovegetal/everloncidrigobelo3646/organismos-do-solo.pdf>>. Acesso em: 03 de out. de 2024.

ROMEIRO, R.S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, **Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa**. 2006.

SAJEENA, A.; Nair, D. S.; Sreepavan, K. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent. **Indian Phytopathology**, v. 73, p. 177–183, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00226-x>.

SANCHES, L. A.; Bitencourt, S. O.; Sasaya, M. K.; Garlet, J. Extracts of native forest species of the southern amazon in the control of *Aphis craccivora* koch (Hemiptera: aphididae). **Bioscience Journal**, 37, e37018-e37018. 2021.

SANTOS, A. C. S.; Diniz, A. G.; Tiago, P. V.; Oliveira, N. T. Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. **Fungal biology reviews**, 34(1), 41-57. 2020.

SANTOS, A. C. S.; Oliveira, R. L. S.; Costa, A. F.; Tiago, P. V.; Oliveira, N. T. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. **Journal of Pest Science**, 89: 539-547. 2016. DOI 10.1007/s10340-015-0689-4.

SCHINOR, E. H.; Martelli, I. B.; Pacheco, C. A.; Azevedo F. A. Eficiência de inseticidas no controle de *Praelongorthezia praelonga* em laranjeira doce. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.32, n.2, p.93-102, 2011.

SHARMA, A.; Chandla, V.K.; Thakur, D.R. Biodiversity and Pathogenicity Potential of Mycoflora Associated with *Brahmina coriacea* in Potato Fields of North-Western Indian Hills. **Journal of Entomology** 9: 319-331. 2012.

SMITH, D.; Onions, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. Kew: **Commonwealth Mycological Institute**. 132 p. 1983.

ST LEGER, R. J.; Wang, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect pests. **Appl Microbiol Biotechnol** 85:901–907. 2010.

TOSI, L.; Beccari, G.; Rondoni, G.; Covarelli, L.; Ricci, C. Natural occurrence of *Fusarium proliferatum* on chestnut in Italy and its potential entomopathogenicity against the Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. **Journal of pest science**, 88, 369-381. 2015.

UNFER, R.; Portela, V. O.; Santana, N.; Moro, L.; Santos, Í.; Castro, I.; Freiberg, J.; Jacques, R. Métodos de preservação de fungos em laboratório. **Grandes temas em Agronomia**, p. 10-19, 2019. DOI: 10.29327/511578-1.

VELEZ, B. A. D. A.; Diniz, A. G.; Barbosa, L. F. S.; Santos, A. C. D. S.; Costa, A. F.; Tiago, P. V. Potential of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolates with *Chenopodium ambrosioides* and *Enterolobium contortisiliquum* extracts to control *Dactylopius opuntiae*. **International Journal of Tropical Insect Science**, 39, 131-138. 2019.

WANG, Y.; Li, B.; Shang, H.; Ma, R.; Zhu, Y.; Yang, X.; Ju, S.; Zhao, W.; Sun, H.; Zhuang, J.; Jiao, Z. Effective inhibition of fungal growth, deoxynivalenol biosynthesis and pathogenicity in cereal pathogen *Fusarium spp.* by cold atmospheric plasma. **Chemical Engineering Journal**, v. 437, p. 135307, 1 jun. 2022. DOI: 10.1016/j.cej.2022.135307.

WEILER, R. L.; Teixeira, F. S.; Kaneko, L.; Weiler, C. A. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Lecanicillium longisporum* Zimmerman em *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae) O. **Citrus Research & Technology**, 32(1), 53-58. 2017.

WENDA-PIESIK, A.; Sun, Z.; Grey, W. E.; Weaver, D. K.; Morrill, W. L. Mycoses of wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae) larvae by *Fusarium spp.* isolates. **Environmental Entomology** 38: 387-394. 2009.

WOLFE, J.; Bryant, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**. v. 24, p. 438-450, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-7007\(00\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0140-7007(00)00027-X)