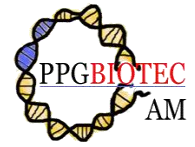




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**Fungos patogênicos a insetos-praga *Monalonium annulipes* do cacauzeiro e *Hypothenemus hampei* do cafeeiro, no Território da Transamazônica e Xingu, PA, e seu potencial biotecnológico.**

**Simone Maria Costa de Oliveira Moreira**

**Manaus - AM**

**2012**

**Simone Maria Costa de Oliveira Moreira**

**Fungos patogênicos a insetos-praga *Monalonium annulipes* do cacauero e *Hypothenemus hampei* do cafeeiro, no Território da Transamazônica e Xingu, PA, e seu potencial biotecnológico.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. JOSÉ ODAIR PEREIRA**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Manaus - AM**

**2012**

Aos meus pais **Gil Costa de Oliveira** (*in memoriam*) e

**Maria Izabel Barros de Oliveira**

Pelo amor,

Pela formação moral, educação e pela eterna confiança,

Por mesmos tão distantes, sempre me incentivaram.

## **DEDICO**

A meu companheiro **Djair**

Pelo amor,

Pela força, quando tudo parecia dar errado,

Por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma.

Aos meus filhos **Sávio e Samira**

Pelo amor,

Por estarem sempre ao meu lado,

Por me fazer feliz e tornar minha vida mais leve.

## **OFEREÇO ESPECIALMENTE**

“Bem sei que tudo podes, e que nenhum dos Teus propósitos poderá ser impedido” Jó 42:2.

“Jesus respondeu: O que é impossível aos homens é possível a Deus” Lc 18:27.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, que sempre esteve comigo e nos momentos mais difíceis me levantou;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFAM pela oportunidade;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, por ter me aceito como orientanda, pela orientação, pelo incentivo e pelo exemplo de profissional o qual seguirei por toda minha vida;

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, pelo apoio, interesse e orientação dispensados;

Ao Prof. Dr. Rainério Meireles da Silva por ter cedido a infraestrutura da Universidade Federal do Pará - Campus Universitário de Altamira;

Ao Prof. Dr. Miguel Alves Júnior pelo uso do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Pará - Campus Universitário de Altamira;

Ao Prof. Dr. José Augusto Teston pela identificação dos insetos;

À Prof. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela oportunidade de utilizar a infraestrutura de seu laboratório – ESALQ/USP;

À Dra. Joelma Marcon que muito me orientou no laboratório de Genética de Microrganismos-ESALQ/USP, meu muito obrigada, foi muito valiosa sua orientação;

À Dra. Carol Quecine, pela ajuda no experimento com as enzimas e nas análises estatísticas;

Aos professores Dr. Rudi Procópio, Dra. Cristina Maki e Dra. Rozana Galvão que participaram de minha banca de qualificação;

Ao Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, pelo seu constante incentivo, apoio e amizade;

À Prof. Dra. Doriane Rodrigues Picanço, sempre muito solícita para comigo, cedendo sempre a sala de estudo dos seus orientados;

Às secretárias Elzimar e Nubiane que me aturaram durante esses anos de curso;

Aos amigos do curso de Pós-Graduação, especialmente minhas “grandes amigas” Adriana Dantas, Ginarajadaça;

Às minhas companheiras de laboratório (UFPA): Mara Sena, Adriana Maciel e Denise Nascimento;

Ao Zezo, técnico do laboratório de Genética de Microrganismos - ESALQ/USP, por sua atenção e apoio na realização dos experimentos;

Ao Prof. M.sc. Ronilson de Souza Santos pela confecção do mapa de localização;

À meu cunhado Airton e família, a minha família de Manaus (Raquel e filhos, Ivanilde, Lila, Tais e Ilais), a minha amiga Luciana e família por todo apoio durante o curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa, núcleo de apoio na Transamazônica, por permitir coletas em seu campo experimental em Altamira, PA;

Ao Sindicato dos Trabalhadores e Trabalhadoras Rurais de Medicilândia-PA, especialmente ao Bruno da Costa Venturim pelo apoio nas coletas de campo nas áreas de cacauero;

Ao Prof. Dr. Djair Alves Moreira, pela dedicação e sugestões no trabalho. Sua confiança, seu apoio, sua paciência e companheirismo foram fundamentais para a realização deste trabalho;

A todos vocês, meu muito obrigado.

# FUNGOS PATOGÊNICOS A INSETOS-PRAGA *Monalonium annulipes* DO CACAUEIRO E *Hypothenemus hampei* DO CAFEIEIRO, NO TERRITÓRIO DA TRANSAMAZÔNICA E XINGU, PA, E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

## Resumo

O interesse pelo uso de microrganismos entomopatogênicos na agricultura vêm aumentando significativamente nos últimos anos, diante dos problemas inerentes à inadequada utilização de agrotóxicos, pelo acúmulo de resíduos no ambiente e desequilíbrios ecológicos. Atualmente, as instituições de pesquisa estão preocupadas em identificar um maior número de microrganismos com potencial de utilização no controle biológico de pragas que sejam adaptados ao ecossistema local. Por questões econômicas, tem aumentado a procura por tecnologias que contribuam para uma agricultura sustentável e como resposta, o controle microbiano, mais precisamente com fungos entomopatogênicos é uma alternativa promissora. O cacaueteiro é a principal cultura do Território da Transamazônica e Xingu, Pará, sendo o município de Medicilândia o maior produtor brasileiro. O cafeeteiro é uma cultura que teve grande expressão na região, especialmente *Coffea canephora* cv. Conilon, e apresenta potencial para se tornar grande cultura devido a disponibilidade de áreas. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo a identificação de fungos entomopatogênicos de ocorrência natural que poderão ser utilizados no biocontrole de insetos-praga de plantas cultivadas, visando o menor desequilíbrio ao meio ambiente. Como objetivos específicos propôs-se a: i) coletar, isolar, identificar e caracterizar fungos entomopatogênicos de ocorrência em insetos-praga das culturas do cafeeteiro e cacaueteiro; ii) avaliar a eficácia de agentes microbianos identificados quanto à patogenicidade e virulência em condições controladas e; iii) testar a produção de enzimas quitinases, pectinases, amilases, celulases e lipases nos isolados obtidos e identificá-los por métodos clássico e molecular. O trabalho teve início com várias visitas em áreas de pastagens, capoeiras e lavouras de cacaueteiros e cafeeteiros nos municípios de Altamira, Brasil Novo e Medicilândia. Os insetos parasitados encontrados foram brocas-do-café (*Hypothenemus hampei*), no cafeeteiro, um inseto da ordem Hemiptera, não identificado, e monalônio (*Monalonium annulipes*), no cacaueteiro, todos colonizados por fungos. Nos locais onde foram encontrados os insetos parasitados, coletou-se solos para possível identificação de isolados entomopatogênicos, exceto onde foi encontrado o monalônio. Foram encontrados 14 isolados de fungos colonizando insetos, sendo as principais espécies *Verticillium* spp., *Penicillium citrinum*, *Hiphopichia burtonii* e *Fusarium* sp. e no solo *Rhinochadiella* sp.,

*Cladosporium sphaerospermum*, *Verticillium* sp. e *Pseudallescheria boydii*. Na análise da atividade enzimática observou-se que os isolados do solo apresentaram as maiores degradações dos substratos testados. No bioensaio realizado contra broca-do-café, com 7 isolados, os que apresentaram maior índice de mortalidade foram *H. burtonii*, e Icaf 5, com 96, 94 e 62%, respectivamente, sendo os mais patogênicos. Contra o monalônio, o isolado Icac 3, *Fusarium* sp, colonizou 96% dos insetos nos dez dias de avaliação. Assim, considera-se que os isolados estudados demonstraram potencial importante para serem introduzidos em programas de biocontrole, com perspectivas de resultados promissores para controle microbiano de insetos-praga e atividade enzimática.

Palavras-chave: Controle microbiano, atividade enzimática, microrganismos, monalônio, broca-do-café e biotecnologia.

**THE PATHOGENIC FUNGI INSECTS-PRAGUE *Monalonium annulipes* OF CACAO AND *Hypothenemus hampei* COFFEE, AND THE TERRITORY THE TRANS XINGU, PA, AND ITS POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL**

**Abstract**

Interest in the use of entomopathogenic microorganisms in agriculture have increased significantly in recent years, faced with problems of inadequate use of pesticides, the accumulation of waste on the environment and ecological imbalances. Currently, the research institutions are concerned to identify a greater number of microorganisms with potential use in biological control of pests that are adapted to the local ecosystem. On economic issues, has increased the demand for technologies that contribute to sustainable agriculture and in response, microbial control, more precisely with entomopathogenic fungi is a promising alternative. Cacao is the main crop of the Trans Territory and Xingu, Pará, and the municipality of Medicilândia the largest Brazilian producer. The coffee is a crop that had great expression in the region, especially *Coffea canephora* cv. *Conilon*, and has the potential to become important culture due to availability of culturable areas. In this context, the study aimed to identify naturally occurring entomopathogenic fungi that could be used in biocontrol of insect pests of cultivated plants, seeking the lowest imbalance to the environment. The specific objectives aimed to: i) collect, isolate, identify and characterize the occurrence of entomopathogenic fungi in insect pest of coffee and cocoa, ii) evaluate the effectiveness of microbial agents identified as the pathogenicity and virulence under controlled conditions and iii) testing the production of chitinase enzymes, pectinases, amylases, cellulases and lipases in the isolates obtained and identify them by molecular and classical methods. The work began with several hits on pastures, barns and crops of cocoa and coffee in the municipalities of Altamira, Brazil and New Medicilândia. The parasitized insects were coffee borers (*H. hampei*) one insect of the order Hemiptera, unidentified, and *M. annulipes* (monalônio) in cocoa, all colonized by fungi. Where were found parasitized insects, soil was collected for possible identification of entomopathogenic isolates, except where it was found monalônio. We found 14 isolates of fungi colonizing insects, being the main species *Verticillium* spp., *Penicillium citrinum*, *Hiphopichia burtonii* and *Fusarium* sp. and soil *Rhinochadiella* sp., *Cladosporium sphaerospermum*, *Verticillium* sp. and *Pseudallescheria boydii*. The analysis of enzymatic activity observed that soil isolates showed the largest degradation of substrates. In



bioassay performed against coffee berry borer, with 7 isolates, which have shown highest mortality two *H. burtonii*, and Icaf 5 were the most pathogenic. Monalônio against the isolated *Fusarium* sp, colonized 96% of the insects in the ten-day trial. Thus, it is considered that the strains showed significant potential to be introduced in biocontrol programs, with prospects promising results for microbial control of insect pests and enzyme activity.

Keywords: Control microbial, enzymatic activity, microorganisms, monalônio, coffee berry borer and biotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Danos causados por <i>Monalonium</i> nos frutos de cacaueteiro no Território da Transamazônica e Xingu. Altamira, Pará, 2012. Fotos da autora.....	24
Figura 2. Mapa de localização das áreas de coleta de insetos e solo: Altamira, Brasil Novo e Medicilândia. Altamira, Pará, 2012.....	37
Figura 3. Recipientes usados na criação em laboratório da (A) <i>H. hampei</i> e (B) <i>M. annulipes</i> . Altamira, Pará, 2012.....	38
Figura 4. Bioensaio do monalônio com o isolado encontrado colonizando insetos no Território da Transamazônica e Xingu, Altamira, 2012.....	41
Figura 5. Bioensaio da broca-do-café com os isolados encontrados colonizando insetos no Território da Transamazônica e Xingu. Altamira, Pará, 2012.....	42
Figura 6. Insetos colonizados: a) <i>Monalonium annulipes</i> e b) <i>Hypothenemus hampei</i> . Altamira, Pará, 2012.....	47
Figura 7. Colônias de a) <i>P. citrinum</i> , b) <i>H. burtonii</i> , c) <i>Verticillium</i> spp. e d) <i>Fusarium</i> spp.....	48
Figura 8. Formação de halos pelos isolados nos substratos: a) amido, b) CMC, c) tween 20, d) pectina pH 5 e, e) pectina pH 8. Altamira, Pará, 2012.....	53
Figura 9. Atividades enzimáticas dos isolados de fungos obtidos de insetos e solo em diferentes substratos: a) amilase, b) CMC, c) lipase, d) pectina pH 5,0, e) pectina pH 8,0 e, f) quitinase. Altamira, Pará, 2012.....	60
Figura 10. Porcentagem de mortalidade de <i>M.annulipes</i> por <i>Fusarium</i> sp. Altamira, Pará, 2012.....	61
Figura 11. Porcentagem de mortalidade de brocas-do-café por isolados de fungos: a) Icac 1, b) Icaf 1, c) Icaf 2, d) Icaf 3, e) Icaf 4, f) Icaf 5, g) Icac 2. Altamira, Pará, 2012.....	64

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Isolados de fungos obtidos de insetos e solo encontrados em plantas do cafeeiro e cacauero no Território da Transamazônica e Xingu, Pará, 2012.....	47
Tabela 2. Identificação molecular dos isolados de fungos obtidos de insetos e solo encontrados em plantas do cafeeiro e cacauero no Território da Transamazônica e Xingu. Altamira, Pará, 2012.....	49
Tabela 3. Médias de índice de atividade amilolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.....	54
Tabela 4. Médias de índice de atividade celulolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.....	55
Tabela 5. Médias de índice de atividade lipolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.....	56
Tabela 6. Médias de atividade pectinolítica - pectina pH 5,0 apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.....	57
Tabela 7. Médias de atividade pectinolítica - pectina pH 8,0 apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solo em Altamira, Pará, 2012.....	58
Tabela 8. Médias de atividade quitinolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.....	59
Tabela 9. Índice de mortalidade do inseto <i>M. annulipes</i> pelos fungos isolados de insetos de cacauero. Altamira, Pará, 2012.....	61
Tabela 10. Índice de mortalidade do inseto broca-do-café pelos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.....	63

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1. Histórico do controle microbiano de insetos praga.....	15
2.2. O Controle Biológico de Insetos no Brasil.....	16
2.3. Fungos no controle biológico.....	16
2.4. Microbiologia do solo.....	20
2.5. A cultura do cacaueteiro na Amazônia.....	21
2.5.1. A praga monalônio – <i>Monalonium annulipes</i> (Hemiptera: Miridae).....	23
2.5.1.1. Estratégia de controle do monalônio – <i>M. annulipes</i> .....	24
2.6. A cultura do cafeeiro na Amazônia.....	25
2.6.1. A praga broca-do-café – <i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae).....	27
2.6.1.1. Estratégia de controle da broca-do-café.....	27
2.7. Enzimas de importância para os fungos entomopatogênicos.....	28
2.7.1. Quitinases.....	29
2.7.2. Celulases.....	30
2.7.3. Pectinases.....	31
2.7.4. Amilases.....	32
2.7.5. Lipases.....	33
2.8. DNA e PCR.....	34
2.9. Realização de bioensaios.....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. Localização e características das áreas de coleta.....	37
3.2. Procedimentos de coleta de insetos e solo.....	38
3.3. Isolamento e armazenamento de fungos.....	39
3.3.1. Isolamento de fungos a partir de insetos – superfície.....	39
3.3.2. Isolamento de fungos a partir de insetos – interno.....	39

3.3.3. Isolamento de fungos a partir de solo.....	40
3.4. Avaliação do crescimento vegetativo.....	40
3.5. Os Bioensaios.....	41
3.5.1. Monalônio.....	41
3.5.2. Broca-do-café.....	42
3.6. Identificação dos isolados de fungos.....	43
3.6.1. Pelo método clássico.....	43
3.6.2. Pelo método molecular.....	43
3.7. Avaliação da atividade enzimática.....	44
3.8. Análises estatísticas.....	46
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
4.1. Insetos colonizados e fungos de solo.....	46
4.2. Identificação dos isolados de fungos obtidos de insetos parasitados.....	47
4.3. Identificação dos isolados de fungos de solo.....	50
4.4. Crescimento vegetativo dos isolados encontrados nos insetos e nos solos.....	51
4.5. Atividade enzimática dos isolados.....	52
4.6. Bioensaio contra o <i>M. annulipes</i> .....	60
4.7. Bioensaio contra a broca-do-café.....	63
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um reino de alta importância e ainda pouco explorado do ponto de vista biotecnológico. O reino dos fungos tem cerca de 1,5 milhões de espécies e apresenta enorme importância biotecnológica. Das espécies de fungos no nosso planeta, a grande maioria é de utilidade para a produção de fármacos, enzimas, ácidos orgânicos e etanol, apenas para citar alguns exemplos de produtos de valor aplicado provenientes dos fungos. Com as novas técnicas de melhoramento genético aliada às técnicas clássicas, o melhoramento genético de fungos tem contribuído para o incremento da produção de compostos de importância biotecnológica e desenvolvimento de processos nas áreas da agropecuária, saúde humana e animal, redução de poluentes, entre outras (AZEVEDO, 2004).

A produção do antibiótico penicilina a partir do fungo *Penicilium chrysogenum*, é o exemplo de maior sucesso na área de melhoramento genético, com a obtenção de aumento de produção de penicilina em milhares de vezes nas linhagens melhoradas. Tudo isso foi razão mais que suficiente para que a genética de fungos adquirisse a importância que tem atualmente (AZEVEDO, 2004).

Um dos campos de interesse em biotecnologia é o controle biológico de pragas agrícolas. As espécies que parasitam insetos estão presentes em praticamente todos os grupos taxonômicos de fungos verdadeiros conhecidos. Esses parasitas possuem, basicamente, dois modos de colonização do hospedeiro: o ectoparasitismo e o endoparasitismo. O endoparasitismo apresenta várias características biotecnológicas importantes que vêm sendo exploradas, principalmente no que diz respeito ao controle biológico de insetos responsáveis por danos na agricultura (MELO; AZEVEDO, 2000).

O controle biológico apresenta papel de destaque, sendo recomendado para manter as pragas em baixos níveis populacionais. Esses organismos, quando adequadamente aplicados, apresentam pequeno impacto ambiental, não acarretam riscos de intoxicação aos homens e animais, podem permanecer por longos períodos no ambiente, não deixam resíduos nos produtos e podem ser empregados juntamente com outros métodos de controle (IEDE, 2010).

O interesse pelo uso de fungos entomopatogênicos na agricultura vem aumentando significativamente nos últimos anos, devido aos problemas inerentes à inadequada utilização de agrotóxicos, principalmente sob o ponto de vista de resíduos e de desequilíbrio ecológico. No entanto, para que tais agentes possam ser utilizados em larga escala torna-se necessário que sejam produzidos em grandes quantidades. Para causar menor impacto ambiental estão

sendo criadas medidas de controle, e o controle biológico é o que vem sendo mais estimulado. (OLIVEIRA, 2000).

A necessidade de reduzir os impactos ambientais causados pelo uso excessivo de agrotóxicos tem motivado estudos de formas alternativas para o controle de pragas, entre elas, a utilização de fungos entomopatogênicos. Algumas espécies, como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* apresentam amplo espectro de hospedeiros e alta variabilidade genética, por isso é fundamental realizar bioensaios para selecionar isolados mais virulentos à praga-alvo (ALVES, 1998; SANTORO, 2007). As principais vantagens do uso de microrganismos entomopatogênicos para controle de pragas são a especificidade e a seletividade desses agentes de controle, bem como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e a ausência de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não alvo (ALVES, 1998). Também os insetos não desenvolvem, a não ser por curto período de tempo, resistência aos microrganismos usados no controle biológico, pois se resistência ocorrer no inseto, devido ao número muito superior da população do microrganismo usado em relação ao número de insetos resistentes, vai ocorrer mutação no microrganismo tornando-o novamente capaz de atacar o inseto anteriormente resistente. Como no Território da Transamazônica e Xingu, a agropecuária é bastante forte e os problemas com pragas representam grande impacto econômico, pesquisas dessa natureza se fazem necessárias para avaliar o potencial de novas formas de controle.

No Brasil, os programas de controle biológico proporcionam redução de produtos químicos nas lavouras. Nesse sentido, há grande relevância na identificação de novos microrganismos que possam ser utilizados em programas de biocontrole, e que possam favorecer resultados significativos tanto á nível ambiental, como para a produção de alimentos menos contaminados por resíduos tóxicos.

Como a Amazônia é um ecossistema de grande biodiversidade, e os Estados que formam esta região possuem clima diferenciado do resto do Brasil, é possível que muitos fungos ainda não identificados possam ser descobertos, pois essas condições são ideais para o desenvolvimento de várias espécies de patógenos. As pragas de importância na região são *Monalonium annulipes* (Hemiptera: Miridae), que vem causando danos severos às plantações de cacaueteiro, principalmente no município de Medicilândia-PA, e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) broca já conhecida na cultura do cafeeiro. Dessa maneira, a busca por isolados de fungos capazes de controlar essas e outras pragas é de grande valor biotecnológico, especialmente considerando-se que pouco tem sido feito na procura de

microrganismos úteis que possam fortalecer um desenvolvimento sustentável, com redução do uso de agrotóxicos na Região Amazônica.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a identificação de fungos entomopatogênicos de ocorrência natural que poderão ser utilizados no biocontrole de insetos-praga de plantas cultivadas no Território da Transamazônica e Xingu, no Estado do Pará, visando o menor desequilíbrio ao meio ambiente.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Histórico do controle microbiano de insetos praga**

O conhecimento das doenças causadas por microrganismos em insetos não é algo recente. Segundo Alves (1998) há cerca de 2.200 a.C. os egípcios fizeram referências a distúrbios apresentados por abelhas. Posteriormente, chineses e gregos demonstraram conhecer determinadas enfermidades do bicho-da-seda e abelhas. Anderson e Ignoffo (1967), citados por Nery Conti (1986), relataram que a descrição de doenças de abelhas por Aristóteles em seu livro “História Animalium”, é provavelmente o mais antigo relato de uma doença de insetos.

Especificamente, o primeiro patógeno de insetos de que se tem notícia foi um fungo do gênero *Cordyceps* controlando um lepidóptero, relatado por Réamur em 1726 (ALVES, 1998). Em 1835, Bassi mostrou que o fungo *Beauveria bassiana* causava doença no bicho-da-seda e pelo aspecto apresentado pelos insetos, à semelhança de um doce confeitado foi chamado de “Muscardine” (SANTOS, 1978). Em 1870, Luis Pasteur salvou da ruína a indústria Francesa da seda ao obter com sucesso o controle de uma doença causada por fungo (DEBACH, 1968, citado por SANTOS, 1978). Em 1879, o russo Metschnikoff obteve o controle de larvas do besouro *Anisoplie austriaca* ao aplicar sobre essas um fungo ao qual denominou *Entomophthora anisopliae*, mais tarde classificado por Sorokin como *Metarhizium anisopliae* (VEEN, 1968).

Azevedo (1998) considera que os danos causados por insetos pragas na agricultura são enormes e de difícil avaliação. Muitos insetos são úteis e até mesmo indispensáveis para a manutenção do equilíbrio biológico, outros causam severos prejuízos.



## 2.2. O Controle Biológico de Insetos no Brasil

O controle dos insetos foi incrementado, especialmente a partir de 1940, pelo uso de inseticidas químicos. Entretanto, seu uso em larga escala, realizado muitas vezes de uma maneira inapropriada, levou à emergência de resistência genética dos insetos a muitos deles. Devido a isso, a situação com respeito aos insetos-pragas da agricultura em geral foi agravada em anos subsequentes ao uso desses produtos (MELO; AZEVEDO, 1998).

Ao considerar-se que cada espécie de inseto é suscetível a pelo menos um microrganismo patogênico, como ocorre com todos os outros organismos vivos, tem-se uma pequena noção da importância do estudo dessas doenças no contexto das pragas, principalmente (ALVES, 1998).

Alguns pesquisadores como Pereira et al., (2004), ressaltaram que o uso de agrotóxicos tem sérias restrições devido a contaminação do meio ambiente, danos à saúde humana, além de afetar organismos não alvo, como insetos benéficos, animais silvestres e de criação. Também o uso de agrotóxicos em grande escala resulta na emergência de formas resistentes de insetos, inviabilizando o controle. Dessa forma o controle microbiano é uma alternativa viável, permitindo reduzir os danos causados pelas pragas, mantendo a viabilidade econômica do sistema produtivo sem causar impactos negativos ao meio ambiente.

Dessa forma, por razões econômicas e ambientais, tem crescido a demanda por tecnologias alternativas que contribuam para uma agricultura sustentável. Como resposta, a pesquisa científica tem avançado no desenvolvimento de soluções tecnológicas, entre elas o controle microbiano por fungos entomopatogênicos (LOUREIRO; MONTEIRO, 2004, 2005; SANTOS et al., 2007).

Existem aproximadamente 2,5 milhões de espécies conhecidas de insetos sendo que 10% desde total podem ser consideradas pragas. Fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae*, são capazes de controlar os insetos praga, sendo que para um controle eficiente é necessário realizar uma seleção de fungos entomopatogênicos e avaliar vários parâmetros biológicos e bioquímicos, como a produção de enzimas (RUSTIGUEL et al., 2011).

## 2.3. Fungos no controle biológico

Os microrganismos mais frequentes que se encontram parasitando insetos são os fungos. Coutinho (1996) estimou que os fungos fossem responsáveis por 80% das doenças em

insetos. Azevedo (1998) relata que um dos primeiros fungos entomopatogênicos descritos foi o *Cordyceps sinensis*, em 1726, mas a patologia de insetos somente veio a ser estudada por Agostino Bassi, que foi o primeiro autor a demonstrar o ciclo patógeno-hospedeiro-patógeno, antes mesmo do postulado de Koch.

Dentre os entomopatógenos, os fungos são os organismos que apresentam maior potencial, pois seu modo de ação é baseado, principalmente, no contato do inseto com os conídios, ao contrário dos vírus e bactérias que agem após ingestão. Além disso, exigem menor umidade no ambiente se comparados aos nematóides entomopatogênicos (ALVES; LECUONA, 1998; AZEVEDO, 1998). Os conídios e os esporos dos fungos têm alta capacidade de dispersão horizontal, sendo transportados por vários agentes a grandes distâncias (CASTRILLO et al., 2005).

Os fungos constituem-se os principais patógenos de insetos a serem utilizados como bioinseticidas. De acordo com Alves (1998) cerca de 80% das doenças de insetos tem sua origem em fungos pertencentes a 90 gêneros e mais de 700 espécies, sendo que a maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já identificados ocorre no Brasil, e desses, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica. Para Putzke (2002), o número de fungos com potencial para emprego como controladores biológicos já ultrapassa 750 espécies e 85 gêneros. Com este histórico, o controle microbiano de insetos praga com fungos é uma alternativa viável com alto potencial de utilização sem prejudicar os recursos naturais.

Os fungos apresentam várias vantagens como agentes de controle biológico por ter capacidade de atacar insetos em todos os estágios de desenvolvimento (ALVES, 1998; SAMUELS et al., 2002; FERREIRA et al., 2005; RAMPELOTTI et al., 2007; ANAND et al., 2009; BARROS et al., 2010) e por estarem presentes como componentes naturais em muitos ecossistemas terrestres (BARROS et al., 2010).

O processo de infecção dos insetos inicia-se com a adesão e a germinação dos conídios sobre a cutícula do hospedeiro, seguida da penetração do conídio no tegumento do inseto, a qual ocorre por ação mecânica e enzimática. Com a penetração do fungo no inseto, as hifas entram em contato com a hemolinfa do inseto. A morte do hospedeiro infectado geralmente ocorre durante a colonização da hemolinfa, quando este sofre depleção de nutrientes (BARROS et al., 2010).

Entre os gêneros mais estudados e difundidos no controle biológico destacam-se o *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (AZEVEDO, 1998; FARIA; MAGALHÃES, 2001). A ocorrência natural desses

entomopatógenos constitui fator importante para a redução populacional das pragas no meio ambiente, favorecendo o equilíbrio biológico dos agroecossistemas.

O gênero *Metarhizium* abrange quatro espécies descritas: *M. album*, *M. flavoviride*, *M. anisopliae* e *M. taii*. *M. anisopliae* apresenta cinco variedades: *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *dcjhyium* (DONG et al., 2007; YANG et al., 2009). *M. anisopliae* apresenta micélio septado e hialino, com conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos.

No Brasil é um dos fungos mais utilizados no controle microbiano de pragas, sendo capaz de infectar e matar em torno de trezentas espécies de artrópodes. Tem sido aplicado no controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), da broca-da-cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), e das cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*) (BARROS et al., 2010).

Em várias pragas de importância econômica os fungos do gênero *Beauveria* parasitam vários artrópodes e têm-se obtido resultados importantes para *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) praga mais importante do cafeeiro (OLIVEIRA et al., 2003); *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), praga em aviários comerciais (SANTORO et al., 2008; ALVES et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2008) e *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Curculionidae), praga da batata-doce (ONDIAKA et al., 2008).

Ao analisar o processo infectivo dos fungos do gênero *Beauveria*, Campos (2005) observou a produção de proteases do tipo subtilisina e quitinases em presença de cutícula de ácaros, as quais podem estar envolvidas no processo de patogenicidade.

No âmbito internacional, o fungo *B. bassiana* tornou-se conhecido pelo produto Boverin que foi utilizado e formulado na antiga União Soviética, em 1970, para ser utilizado no controle do besouro do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (SAMSINAKOVA, 1966; IGNOFFO, 1975). No Brasil, um dos principais projetos com esse fungo foi para o controle dos cupins das pastagens (ALVES, 1998).

O gênero *Nomurea* ocorre infectando insetos praga das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera. A principal espécie desse gênero é a *N. rileyi*, que ataca mais os insetos da ordem Lepidoptera, da família Noctuidae (SUWANNAKUT et al., 2005). Para a penetração do fungo no tegumento do inseto ocorre uma pressão mecânica e atividade enzimática de quitinases, proteases e lipases.

A espécie *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (Deuteromicotina: Hyphomycetes) (Zimm.) Viègas, foi descrita pela primeira vez em 1861 parasitando a cochonilha *Saissetia coffea*, e também foi coletada em um grande número de espécies de insetos e ácaros

(GILLESPIE; CLAYDON, 1989). O espectro de espécies que ela ataca é amplo e inclui insetos homópteros (afídeos, coccídeos e aleirodídeos), entre outros grupos (STEENBERG; HUMBER, 1999). Devido sua eficiência para o controle de pragas foi produzido na Inglaterra, o primeiro produto comercial, o Mycotal, formulado com conídios contra aleirodídeos e tripes e, Vertalec, formulado com blastospóros contra afídeos, sendo estes produtos disponíveis no mercado Europeu (NILSSON; GRIPWALL, 1999). Mycotal é um pó molhável que foi utilizado no controle de *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) e *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) na Holanda (Van der SCHAAF et al., 1990; ROVESTI et al., 1997).

Os fungos entomopatogênicos produzem toxinas que são altamente efetivas contra os insetos, daí a causa da sua morte. Dentre as toxinas já conhecidas destacam-se a beauvericina (*B. bassiana*), dextruxinas (*M. anisopliae*), aspocracina (*Aspergillus ochraceus*) e cordicepina (*Cordyceps*).

As vantagens do controle com fungos entomopatogênicos estão na especificidade e seletividade, sendo que este mantém as populações de parasitóides, predadores e polinizadores, ao contrário do que ocorre quando se emprega a maioria dos inseticidas químicos. Os patógenos também possuem a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, isto ocorre porque esses podem permanecer no ar, no solo ou nos cadáveres (ALVES, 1998; CASTRILLO et al., 2005).

A ação dos entomopatógenos é mais lenta e a maioria necessita de condições adequadas de temperatura, umidade, luminosidade e radiação para serem eficientes, devendo ter uma aplicação correta e um armazenamento adequado, para manter sua viabilidade e patogenicidade (ALVES, 1998; LORD, 2005).

No Brasil ocorre à produção massal de fungos entomopatogênicos para o controle de diversos insetos, essa produção é realizada utilizando arroz cozido como substrato. Após a colonização, a mistura é triturada e comercializada na forma de pó molhável e/ou suspensão oleosa. Algumas usinas de cana-de-açúcar têm sua própria produção para utilização nas suas lavouras (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

Os micopesticidas mais comercializados no Brasil pertencem aos fungos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Sporothrix* (controla o percevejo de renda da seringueira) (BARROS et al., 2010). Em escala mundial os produtos mais comuns já desenvolvidos são micopesticidas a base de *B. bassiana* (33,9%), *M. anisopliae* (33,9%), *Lecanicillium* spp. (9,4%), *Isaria fumosorosea* Wise (5,8%) e *B. brongniartii* (Sacc.) Petch (4,1%) (FARIA; WRIGHT, 2007).

## 2.4. Microbiologia do solo

O solo é o habitat das plantas e de várias espécies de bactérias, fungos, protozoários e animais invertebrados, os quais contribuem para a manutenção da produtividade nos agroecossistemas (GILLER, 1997). De acordo com Kennedy e Gewin (1997), o papel dos microrganismos no solo é bastante diverso, agindo como decompositores de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, interações micorrizas e rizóbio-leguminosas.

Embora a produtividade de sistemas agrícolas dependa da atividade de microrganismos do solo, a biodiversidade das comunidades microbianas do solo e seu efeito sobre a estabilidade de sistemas agrícolas são praticamente desconhecidos. Isso devido à dificuldade de cultivo de muitos microrganismos e da definição de grupos taxonômicos adequados (PANKHURST et al., 1996).

A grande maioria dos fungos vive no solo e são encontrados atuando na degradação de material vegetal morto, ou sob forma inativa como propágulos, ou em estágios latentes presentes no solo. Existem limitações para detectar a verdadeira diversidade do ambiente escolhido, pois alguns existem somente na forma micelial e são difíceis de serem identificados, por falta de corpos de frutificação, embora atualmente possam ser classificados por técnicas de biologia molecular. Apenas uma pequena porcentagem das espécies são cultiváveis em meios comuns, portanto, o método clássico de observação direta em microscopia e cultivo em placas, podem levar a subavaliação da verdadeira diversidade no ambiente (BRIDGE; SPOONER, 2001).

Naturalmente o solo é um reservatório de fungos, entre eles os entomopatogênicos. Esses fungos têm sua estabilidade influenciada tanto por fatores bióticos como abióticos. A sobrevivência dos fungos depende principalmente da temperatura e conteúdo de água no solo. A temperatura ideal do solo para persistência de fungos entomopatogênicos varia bastante de acordo com a linhagem do fungo, tipo de solo, umidade e antagonistas. Temperaturas baixas ou medianas e valores intermediários de saturação favorecem a sobrevivência dos conídios (LINGG; DONALDSON, 1981), enquanto altas temperaturas e teores de saturação elevados reduzem a sobrevivência (STUDDERT; KAYA, 1990).

Fatores como tipo de solo, grau de compactação, pH e textura podem exercer efeito significativo na sobrevivência dos conídios. O ambiente do solo pode ser visto como um ecossistema extremamente complexo envolvendo e interferindo com as interações primárias entre insetos hospedeiros e patógenos fúngicos, ou pode ser visto como um ecossistema simples e estável que abriga a interação patógeno-hospedeiro (RATH, 2002).

Frutos de café infestados por insetos caídos no solo são considerados a principal fonte de reinfestação das plantações de cafeeiro durante o período de colheita (LANZA et al., 2004). Ao emergir desses frutos à procura de novos frutos para colonização, as brocas levam consigo esporos de fungos e os inoculam nos frutos sadios da parte aérea das plantas, agindo assim como vetores no transporte destes microrganismos. A presença de *Paecilomyces lilacinus* no solo de cafezais atacando a broca-do-café em condições naturais foi registrado por Bustillo et al. (1999).

## 2.5. A cultura do cacauero na Amazônia

No início do século XVII, o cacauero foi citado pela primeira vez na literatura botânica, por Charles de L'Écluse que o descreveu com o nome de *Cacao fructus*, porém, em 1737 foi classificado por Linneu como *Theobroma fructus*, para em 1753 ser modificado para *Theobroma cacao*, o qual permanece até hoje (SILVA NETO, 2001).

O cacauero é uma planta da família *Sterculiaceae* (PURDY; SCHMIDT, 1996), gênero *Theobroma* e espécie *Theobroma cacao* L. A família possui cerca de 50 gêneros, compreendendo 750 espécies e o gênero *Theobroma* é o de maior destaque por apresentar espécies de importância econômica como o cacauero. Todas as espécies desse gênero são diplóides, com  $2n=20$  cromossomos (SILVA; FILGUEIRA; SOUZA, 2001).

A espécie *T. cacao* é formada principalmente de árvores e arbustos, cultivadas na faixa equatorial entre os paralelos  $20^{\circ}$  e latitudes norte e sul (PURSEGLOVE, 1968). A planta pode atingir 5 a 8 m de altura e 4 a 6 m de diâmetro da copa, quando proveniente de semente (PURDY; SCHMIDT, 1996; FERREIRA, 1997; SILVA NETO, 2001). Acredita-se que teve sua origem nas cabeceiras da Bacia Amazônica, de onde se dispersou em duas direções, para o leste ao longo do Rio Amazonas, dando origem ao tipo denominado “Forasteiro” ou “Amelonado” e para o norte e oeste, cruzando os Andes, e avançando pela América Central até o sul do México, dando origem ao tipo “crioulo” (BASTOS, 1987; DIAS, 2001). Segundo Dias (2001) o grupo “crioulo” apresenta sementes grandes, arredondadas, cotilédones brancos ou violeta claro, rusticidade e baixa produtividade; porém, o chocolate produzido a partir de suas sementes é mais fino, de melhor sabor e qualidade (RISTERUCCI et al., 2000; MARITA, et al., 2001). Seus frutos maduros são roxos ou amarelos quando maduros, com casca macia com dez sulcos profundos e superfície rugosa. Os cacaueros do grupo Forasteiro apresentam-se em estado silvestre na região da Bacia

Amazônica, produzem sementes púrpuras e achatadas que originam chocolates considerados amargos. São rústicos, produtivos e seus frutos maduros apresentam-se amarelos, com casca dura, superfície lisa de dez sulcos, eles também são divididos de acordo com a razão comprimento/diâmetro: calabacilo (inferior a 1,5:1), amelonado (inferior a 2:1), angoleta (2:1 sem gargalo) e cundeamor (2:1 com gargalo) (MARITA et al., 2001).

Pesquisadores observaram que os caracteres peso de frutos, número de sementes e peso de cotilédones secos evidenciaram uma ampla variabilidade, e que os frutos de cacau provenientes do Estado do Amazonas foram os que apresentaram maior peso, enquanto aqueles originários do Estado do Pará, registraram maior número de sementes e peso de cotilédones secos. Com esses resultados, concluiu-se que os dois Estados apresentam grande importância no planejamento de coletas de materiais genéticos, principalmente devido ao fato de que estes parâmetros estão diretamente relacionados à produção (KOBAYASHI et al., 2001).

O cacauzeiro é planta cauliflora, as flores surgem em almofadas florais no tronco ou nos ramos lenhosos, em uma gema desenvolvida no lugar da axila de uma antiga folha. As flores são hermafroditas e possuem cinco sépalas, cinco pétalas, cinco estaminóides, cinco estames e um pistilo cujo ovário possui cinco lojas (SILVA NETO, 2001).

Na Região Amazônica o cacauzeiro apresenta dois picos de floração: um menor que coincide com o início do período menos chuvoso e um principal, que ocorre no final do período de estiagem e início do período chuvoso, anualmente, um cacauzeiro adulto pode produzir até mais de 100.000 flores. (SILVA NETO, 2001).

O período compreendido entre a polinização e o amadurecimento dos frutos varia de 140 a 205 dias, com uma média de 167 dias. Em geral, de 15 a 31 frutos necessários para obter 1 kg de amêndoa comercial, dependendo da variabilidade genética das plantas (MENDES, 2001).

O fruto de cacau apresenta um pericarpo carnoso composto de três partes: o epicarpo que é carnoso e espesso, o mesocarpo, que é delgado e duro e o endocarpo, que é carnoso. A semente de cacau tem a forma que varia de elipsóide a ovóide, com 2 a 3 cm de comprimento é recoberta por uma polpa mucilagínosa de coloração branca, de sabor açucarado e ácido. As sementes são muito sensíveis às mudanças de temperatura, é o principal produto comercializado, após fermentação e secagem, para a fabricação de chocolate, nas várias formas.

O cacauzeiro é conhecido por fornecer matéria prima para a produção do chocolate, um alimento energético nutritivo, bastante consumido no mundo. Além disso, das sementes

extrai-se a manteiga, que está sendo utilizada na indústria cosmética e farmacêutica, e a polpa vem sendo explorada internacionalmente para a fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias de boa qualidade (MENEZES; CARMO-NETO, 1993).

Na década de 1970 o norte do Brasil revelou-se como um enorme potencial para a cacauicultura, e a Amazônia se transformou num irresistível pólo cacauero nacional. Com a elaboração do Procacau (Diretrizes para a Expansão da Cacauicultura Nacional) foi criado pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) o Departamento Especial da Amazônia, que a dividiu em 08 pólos cacaueros, sendo um deles o Pólo Altamira, localizado na área de influência de Altamira-PA, mais precisamente na área de ação do INCRA/PIC (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária/Projeto Integrado de Colonização), ao longo da Rodovia Transamazônica (BASTOS, 1987).

A cultura do cacauero foi introduzida neste Território, entre os municípios de Altamira e Uruará, de 1976 a 1978, em razão da disponibilidade de áreas com características adequadas de solo e clima, propiciando a convivência com *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* em zonas de escape ou menos favoráveis ao fungo (SILVA; FALESI, 2006). Essa passou a ser a principal cultura perene da região, sendo o município de Medicilândia o maior produtor do Brasil (SILVA NETO, 2001).

A lavoura cacaueira apresenta um diversificado grupo de insetos associados ao seu cultivo, entre os quais os benéficos constituídos por espécies polinizadoras das flores e por parasitóides e predadores que se alimentam de outros insetos. Apresentam ainda o grupo dos nocivos que em determinadas condições favoráveis apresentam nível populacional elevado, causando danos econômicos constituindo-se, desta forma, pragas da lavoura. Dependendo dos hábitos podem danificar brotações, folhas, flores, ramos, troncos e frutos, podendo até levar a planta à morte na fase juvenil (MENDES, 2001).

Ultimamente os produtores de cacau de Medicilândia, PA, têm observado quedas acentuadas na produção devidas ao crescimento das populações de *Monalonium* nas plantações, especialmente nos anos subseqüentes, demandando estudos para a identificação e quantificação do problema, bem como seu controle com eficiência agroecológica.

### **2.5.1. A praga monalônio - *Monalonium annulipes* (Hemiptera: Miridae)**

O *Monalonium annulipes* Signoret, 1858 (Hemiptera: Miridae), ocorre há vários anos na América Central causando danos nos cacauais da Costa Rica (VILLACORTA, 1967). O



gênero *Monalonium* apresenta 11 espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central, das quais oito são associadas à cultura do cacaueteiro. Apenas o *M. annulipes* tem sido constatado nos pólos cacaueteiros da Amazônia, conforme Mendes (2001). Esse inseto era pouco disseminado na Amazônia, mas atualmente seu ataque nas lavouras cacaueteiras, especialmente no município de Medicilândia, tem causado sérios danos sendo considerada hoje a principal praga da cultura.

Os insetos do gênero *Monalonium* recebem várias denominações, variando de acordo com a região. No Estado de Rondônia denomina-se “monalônio”, na Bahia e outras regiões recebe os nomes de “chupança”, “chupança do cacau”, “bexiga”, em consequências dos danos que causa nos frutos. Quando o ataque ocorre nos ramos recebe o nome de “queima” e “emponteiramento” (TREVISAN, 2002). Os insetos adultos e as formas jovens sugam seiva nos ramos, folhas e frutos novos (MENDES, 2001), causando severos danos aos cacauetes da região. São relatadas perdas por danos diretos e indiretos como consequência do ataque do inseto, que ao iniciar sua alimentação, injeta uma substância tóxica no local, causando a morte dos tecidos atingidos (TREVISAN, 2002). Dessa forma, tem sido mencionado por produtores de Medicilândia que plantações que sofrem ataques severos em um ano, apresentam nos anos subseqüentes fortes quedas de produtividade. A Figura 1 ilustra severos danos aos frutos do cacaueteiro provocados pelo monalônio em lavouras de cacaueteiro da região estudada, com prejuízos aos agricultores por comprometer a viabilidade de frutos em todas as fases de desenvolvimento.



Figura 1. Danos causados por *Monalonium* nos frutos de cacaueteiro no Território da Transamazônica e Xingu. Altamira, Pará, 2012. Fotos da autora.

#### 2.5.1.1. Estratégia de controle do monalônio – *M. annulipes*

Com relação a estratégia de manejo, Trevisan (2002) sugere que o controle deve ser feito na fase de instalação do foco da praga e consiste em pulverizar com inseticida adequado, abrangendo duas filas de cacaueteiro ao redor do foco inicial. Uma alternativa aos inseticidas

seria também nessa fase, tentar o controle cultural removendo os frutos ou derrubando os insetos em desenvolvimento no chão, onde não conseguem completar o ciclo. Outra medida sugerida por Mendes (2001) é o plantio de árvores para o sombreamento, já que plantas a pleno sol se tornam mais susceptíveis.

Quanto ao controle biológico, à formiga *Ectatomma tuberculatum* é considerada o principal inimigo natural do *Monalonium* nos cacauzeiros. Ela é predadora de insetos e nos cacauais faz seu ninho no solo tendo o orifício de saída em forma de uma chaminé fixo na base do tronco do cacauzeiro (MENDES, 2001; TREVISAN, 2002). De acordo com estudos feitos por Trevisan (2002) essa formiga foi capaz de evitar os danos nos frutos de cacau, pois as plantas com ninhos de formigas tiveram um aumento de 51% na quantidade de frutos sadios.

Vários inseticidas são recomendados para o controle químico do *Monalonium*, mas para sua aplicação deve ser feito um levantamento da população existente na área, por meio de amostragens efetuadas nos períodos de maior lançamento de frutos. Sugere-se subdividir o cacaual em quadras de 5 hectares, uniformes quanto ao sombreamento e idade das plantas e amostrar 20 plantas por quadra, examinando 5 frutos por planta. Constatada a presença de pelo menos um fruto com ninfas e/ou adultos, está caracterizada uma área foco (MENDES, 2001).

Os principais inseticidas recomendados para o controle químico do *Monalonium* têm como princípio ativo geralmente carbaril, endosulfan, isoprocarb, deltametrina, malation, arprocarb e triclorfon (MENDES, 2001; TREVISAN, 2002). Em Medicilândia, os produtores estão utilizando para controlar o monalonium produtos como Decis, um inseticida piretróide a base de deltametrina que controla diversas pragas em culturas agrícolas, Lorsban, a base de Clorpirifós e Certeiro, a base de Triflumuron, sendo os dois últimos sem indicação para a cultura do cacauzeiro.

## **2.6. A cultura do cafeeiro na Amazônia**

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae*, que abrange mais de 10 mil espécies agrupadas em 630 gêneros. No gênero *Coffea* são descritas aproximadamente 100 espécies de cafeeiros e destas, cinco são exploradas comercialmente, dentre as quais o *C. arabica* (cafeeiros arábica) e o *C. canephora* (variedades ‘Conilon’ e ‘Robusta’) são as mais comercializadas no mercado brasileiro e mundial. A expressão “café Robusta” é uma

denominação genérica que agrupa as cultivares ou variedades botânicas dos cafeeiros ‘Conilon’ e ‘Robustas’, ambas pertencentes a espécie *C. canephora* (TOLEDO; BARBOSA, 1997; MORAES, 2002).

Apesar da cultura do café ter entrado no Brasil pelo Estado do Pará, a expansão da área plantada no Estado iniciou a partir dos anos de 1970 com a chegada dos imigrantes do Sul e Sudeste do Brasil. A cafeicultura representa a base econômica das pequenas e médias propriedades rurais, gerando benefícios sociais e econômicos (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

A expansão da área cultivada foi feita com a importação de materiais selecionados e melhorados para regiões com características edafoclimáticas distintas daquelas encontradas nos pólos cafeeiros do Estado do Pará. Além disso, a pouca tecnologia utilizada nos cafezais da região, também foram geradas para as condições de maiores latitudes, e encontra-se ultrapassada dado o tempo da imigração dos colonos para a região, os quais ainda não vêm recebendo treinamento adequado (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

O Estado de Rondônia figura-se como o principal produtor de *C. canephora*, principalmente das variedades Conilon e Robusta. No Estado do Pará, a produção de café dessas variedades está localizada na Transamazônica, principalmente nos municípios de Altamira e Medicilândia, sendo esta uma região propícia para a cultura por apresentar menores altitudes e temperaturas elevadas. A cultura na região tem se expandido consideravelmente nas três últimas décadas (EMBRAPA, 2001). A Embrapa Amazônia Oriental realizou um trabalho de avaliação da produção de 49 progênies de café da espécie *C. canephora*, no Trópico Úmido Paraense.

A cultura do cafeeiro tem importância para a região, mas sofre com problemas de pragas. A broca-do-café, *H. hampei*, é uma das mais importantes pragas da cultura e seu controle é realizado normalmente utilizando-se produtos químicos sintéticos, o que prejudica a comunidade e o meio ambiente. Todas essas pragas, e doenças como a ferrugem, causam prejuízos da ordem de 30 %, aumentando os custos de produção (REIS; SOUZA, 1998). Nenhuma pesquisa com microrganismos potenciais controladores biológicos de pragas foi realizada nessa área.

### **2.6.1. A praga broca-do-café – *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)**

O cafeeiro é uma cultura que sofre ataque de várias pragas, entre elas destaca-se a broca-do-café *H.hampei* (Ferrari), a principal da cultura na Amazônia, sendo responsável por grandes perdas na produtividade do café Conilon (*C. canephora*) (NEVES; HIROSE, 2005). Estimativa sobre os danos causados pela broca-do-café é da ordem de 500 milhões de dólares, os prejuízos causados em todo o mundo (NEVES; HIROSE, 2005). O ácaro vermelho (*Oligonychus ilicis*) considerado a segunda praga em importância para o cafeeiro Conilon; seguidos pelo bicho-mineiro (*Perileuoptera coffeella*) e a lagarta dos cafezais (*Eacles imperialis*).

As infestações da broca podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como clima, colheita, sombreamento, espaçamento e altitude, comprometendo a produtividade e a qualidade do café (SOUZA; REIS, 1997). As brocas geralmente perfuram os frutos na região da cicatriz floral ou coroa do fruto, em que a fêmea adulta fecunda, abre uma galeria transformando-a numa câmara, onde fará sua postura, após postura sairá para penetrar em outro fruto (EMBRAPA, 2005).

#### **2.6.1.1. Estratégias de controle da broca-do-café**

O controle químico dessa praga baseia-se no uso de inseticidas, principalmente o endossulfam (HIROSE, 2005), além de outros produtos que também são indicados como o Dissulfan, Endofan, Endossulfan e Thiodan (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2001). O controle químico geralmente é feito com uma a duas aplicações do produto, com pulverização direcionada para os frutos. A indicação desses produtos deve levar em consideração a infestação inicial, determinada por amostragem de frutos, sendo indicado iniciar as aplicações com cerca de 3% a 5% de frutos atacados. Mesmo após a aplicação do inseticida, o monitoramento deve continuar e de acordo com a necessidade a segunda pulverização deve ser feita entre 20 e 30 dias após primeira pulverização (EMBRAPA, 2005).

No entanto, a utilização intensiva e repetida de inseticidas químicos leva ao desenvolvimento de resistência do inseto aos produtos (BRUN et al.,1989). Além disso, os agentes de controle biológico das pragas, entre elas a broca, são seriamente atingidos, aumentando ainda mais a necessidade de uso dos produtos químicos convencionais (REIS; SOUZA, 1998).

Para o controle cultural a colheita deve ser bem feita, sem deixar frutos na árvore e no chão, isso ajuda a reduzir sensivelmente a população da broca no cafezal (MATIELLO, 1999). Destruir cafezais velhos e abandonados, nos quais a broca encontra abrigo e se multiplica, além de alertar os vizinhos para que controle a praga evitando focos para outras lavouras.

No controle biológico, os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *V. lecanii* ocorrem naturalmente nas lavouras de café, atingindo a broca-do-café, as cochonilhas, o bicho-mineiro e as cigarras, sendo importantes agentes de controle biológico dessas pragas, assim como *Bacillus thuringiensis*, também com possibilidade de uso na cultura (ALVES et al., 1998; BUSTILLO et al., 1999; BERNAL et al., 1999). Portanto, esses agentes precisam ser conservados, não comprometendo o manejo integrado de pragas (ALMEIDA et al., 2003).

No ano de 2005, pesquisadores da EMBRAPA Rondônia iniciaram uma estudo com a vespa-da-costa-do-marfim (*Cephalonomia* sp.), um importante inimigo natural da broca, buscando conhecer aspectos referentes à biologia da vespa e possibilidade de multiplicação em larga escala para testes em campo (EMBRAPA, 2005).

## **2.7. Enzimas de importância para os fungos entomopatogênicos**

As enzimas são proteínas que aumentam a velocidade das reações sem alterar o processo como um todo. Com o passar dos anos o conhecimento da natureza das enzimas, extratos obtidos de certos tecidos animais e vegetais ou produzidos por bactérias, leveduras e fungos, foram encontradas muitas aplicações técnicas para as mesmas (LEADLAY, 1993).

Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido a sua ampla diversidade bioquímica e a sua suscetibilidade à manipulação genética. Eles crescem rapidamente e, em geral, seus substratos para crescimento são relativamente baratos o que os tornam geralmente disponíveis e de fácil acesso (TUBESHA; DELAIMY, 2003).

Os fungos têm sido bastante utilizados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (BRAGA; DESTÉFANO; MESSIAS, 1999). As enzimas são usadas em grande escala na indústria de tecidos (celulases), detergentes (proteases e lipases), alimentícia (amilases, pectinases, proteases e celulases) e de couro (proteases e lipases) (NIELSEN; OXENBOLL, 1998). Uma das maneiras de se conseguir alta atividade enzimática é o isolamento e seleção de linhagens de microrganismos com tal capacidade.

Normalmente, os produtos de origem fúngica são obtidos por meio de processos fermentativos. Com isso têm-se a vantagem de não ser necessário usar métodos caros de filtração, pois os micélios podem ser facilmente removidos por filtração a vácuo ou centrifugação, obtendo-se um extrato livre de contaminação (ANDRADE, 2002).

Por meio da determinação da atividade enzimática de fungos por difusão em substratos sólidos específicos, diversos autores têm demonstrado a maior ou menor capacidade dos fungos produzirem as enzimas lipase, protease, amilase e celulase (NEIROTTI; AZEVEDO, 1988; PATERSON; BRIDGE, 1994).

Os fungos produzem uma ampla variedade de enzimas, algumas em pequenas quantidades, mas suficientes para os processos bioquímicos envolvidos nas células dos insetos. A complexidade da cutícula dos artrópodes indica que sua penetração requer ação conjunta de várias enzimas (CLARKSON; CHARNLEY, 1996 citado por RIBEIRO, 2006). Dado a esse motivo a importância do estudo da atividade enzimática dos diversos isolados existentes na natureza.

A relação entre a virulência de fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula dos insetos vem sendo estudada por vários autores, e muitos genes e enzimas têm sido caracterizados e estudados, visando verificar a sua participação no processo de infecção (MORAES et al., 2003; SILVA, 2004; BITTENCOURT et al., 2004). O estudo da secreção das enzimas produzidas durante a infecção é importante para se obter uma correlação com a patogenicidade dos isolados (MORAES et al., 2003).

### **2.7.1. Quitinases**

A quitina está presente na parede celular da maioria dos fungos (ADAMS, 2004; HOELL et al., 2005), e é um importante componente da cutícula dos artrópodes (CABIB, 1987). Ela também é o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (DUO-CHUAN, 2006). De acordo com Andersen (1979), nos artrópodes a quitina está organizada em cadeia de poli-N-acetilglicosamina, formando a cutícula que serve como uma potencial barreira contra a invasão de patógenos.

A quitina consiste-se de uma cadeia de poli- $\beta$ -1,4-N-acetilglicosamina e representa em torno de 25-40% da cutícula do inseto (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; SASSÁ, et al., 2008). As cadeias adjacentes de quitina estão interligadas por pontes de hidrogênio, formando

microfibrilas que ficam embebidas e unidas através de ligações cruzadas com moléculas de proteínas, que perfazem cerca de 70% da cutícula (CHAPMAN, 1998).

Análises por difração de raios X revelaram que existem diferentes associações intercadeia entre as moléculas de quitina estabilizadas por pontes de hidrogênio, originando três diferentes formas:  $\alpha$ -quitina, consiste de cadeias antiparalelas de poli-NAcGlc;  $\beta$ -quitina, se caracteriza pela presença de duas cadeias paralelas; e a  $\gamma$ -quitina, que apresenta duas cadeias paralelas e uma antiparalela. Na natureza essas cadeias se distribuem de maneira que a  $\alpha$ -quitina é encontrada na parede celular dos fungos, e as outras duas formas são encontradas em organismos aquáticos e em artrópodes (PATIL et al., 2000).

Além da disponibilização da quitina como nutriente, as quitinases fúngicas estão envolvidas na modificação da quitina estrutural da parede celular de insetos, composta basicamente de quitina e glicanas, na liberação de conídios, na diferenciação e na morfogênese das hifas (GOODAY et al., 1992). As quitinases são também fatores determinantes da virulência durante o parasitismo de fungos fitopatogênicos, micopatogênicos e entomopatogênicos, pois hidrolisam os principais polímeros constituintes da cutícula, proteínas e quitina, organizadas em camadas denominadas exo e endocutícula (St. LEGER et al., 1998; KISHIMOTO et al., 2002; BARRETO et al., 2004).

Nos insetos, as infecções ocorrem pela adesão dos conídios fúngicos e subsequente penetração da sua cutícula protetora, devido à produção de enzimas extracelulares e pressão mecânica exercida pelas estruturas de reprodução dos conídios (KHACHATOURIANS, 1996; SASSÁ et al., 2008).

### **2.7.2. Celulases**

A celulose é uma fonte de carbono renovável, considerada como o mais abundante substrato orgânico existente para a produção de glicose, combustível e insumos para a indústria alimentícia, sendo frequentemente encontrada associada à hemicelulose, lignina e outros polissacarídeos. A celulose é um polímero de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4, que podem ser hidrolisadas por enzimas celulolíticas (LYND et al., 2002).

O processo de hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de um complexo celulolítico, normalmente de fungos, formado por endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -D-glicosidases. Porém, este processo apresenta alto custo e baixa produtividade (ZHANG et

al., 2006; BASSO et al., 2010). Os fungos filamentosos, especialmente Basidiomycetes, são os mais utilizados para a produção dessas enzimas (PANDEY et al., 2000).

As celulasas são usadas em vários processos na indústria alimentícia, principalmente na extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e amido de batata-doce. Dentre os materiais naturais a celulase é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada com ácidos, à glicose (BAYER; LAMED, 1992).

A aplicação das enzimas celulasas e xilanases começaram na década de 80, primeiro em rações animais depois pela adição em alimentos e posteriormente, em indústria têxtil e de papel. Atualmente, estas enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda tem crescido rapidamente. Em 1995 o mercado mundial de enzima superou 1 bilhão de dólares e em 2005, a comercialização ficou estimada em 2 bilhões. As indústrias que vendem enzimas estão concentradas na Europa, Estados Unidos e Japão (BHAT, 2000; MENEZES et al., 2009). As enzimas celulolíticas de fungos têm sido bastante estudadas devido o seu potencial biotecnológico, sua função nutricional é evidente para a degradação da fibra vegetal servindo como fonte de carbono.

### **2.7.3. Pectinases**

O termo pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (SAKAI, et al., 1993). As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pecticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ainda ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (UENOJO; PASTORE, 2007).

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pecticas em protopectina, ácido pectínico, ácido pectico e pectina, sendo estas três últimas total ou parcialmente solúveis em água (JAYANI et al., 2005). As substâncias pecticas são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos vegetais e participam da organização estrutural dos outros componentes da parede celular, tais como celulose e hemicelulose (CASTILHO et al., 2000; PARENICOVA et. al., 2000; VRIES; VISSER, 2001).

Devido à inovação biotecnológica na área das enzimas, novas perspectivas estão sendo criadas e ultimamente o uso de enzimas celulasas, hemicelulasas e pectinases têm



aumentado significativamente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose. Como por exemplo, no amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxteis e de papel, nutrição animal, enriquecimento proteico de alimentos infantil e extração de óleos (ALKORTA et al., 1998; UENOJO; PASTORE, 2007).

O uso da enzima pectinase, de acordo com Ducruet e Glories (2002), proporciona uma maior extração da matéria corante e dos compostos químicos em geral. Para Gump; Halght (1995) a principal vantagem da enzima pectinase é a redução no custo da elaboração do vinho, uma vez que promove uma substituição de ingredientes, eliminação e/ou substituição de coadjuvantes no processamento da uva e elaboração do vinho, processo esse mais eficiente com menos subprodutos indesejáveis, e resultado com aumento na produtividade.

Os fungos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas em meios de cultura. A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum em grupos de microrganismos (BLANDINO et al., 2001).

#### **2.7.4. Amilases**

As enzimas amilolíticas tiveram sua produção iniciada no começo do século passado, devido o interesse industrial na produção de glicose a partir de materiais amiláceos. Soccol et al., (2005) citam que Takamine, em 1914, foi o primeiro a desenvolver o método para a produção microbiológica de enzima em grande escala, a  $\alpha$ -amilase fúngica Takadiastase.

As amilases têm sua aplicabilidade nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústrias de fermentação, química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003; SURMELY et al., 2003; TUNGA; TUNGA, 2003; SZAKACS, 2004; PANDEY et al., 2005; SOCCOL et al., 2005).

As amilases foram descritas em 1811 nos extratos de trigo; em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982). Promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo descobertas

há mais de um século em vários materiais biológicos. Elas são denominadas amilolíticas por promoverem a degradação do amido.

O amido é formado por dois tipos de polímeros amiláceos: a amilose, que é um polímero linear constituído de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ - 1,4 e a amilopectina, que é formada por cadeias curtas de amilose ligadas entre si de modo a formar uma estrutura ramificada, unidas por ligações  $\alpha$ -1,6. As amilases de origem microbiana podem ser subdivididas em exoamilases e endoamilases (MOREIRA et al., 1999). Dentre as exoamilases destacam-se a  $\alpha$ -amilase (1,4  $\alpha$ -glicanohidrolase) e a glicoamilase (1,4  $\alpha$ -glicanoglicohidrolase). Dentre as endoamilases encontra-se a  $\beta$ -amilase (1,4  $\alpha$ -glicanomaltoidrolase) e a pululanase secretada por *Aureobasidium pullulans*, capaz de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,6 (YURLOVA; de HOOG, 1997). Estas enzimas são geralmente encontradas em fungos filamentosos dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus*, que são usados com mais frequência como fonte industrial de amilases.

### 2.7.5. Lipases

As lipases ocorrem amplamente na natureza, sendo encontradas tanto em microrganismos como em animais e vegetais. A ação dessas enzimas, além da importância para a fisiologia do organismo produtor, apresenta aspectos aplicados importantes. O papel das lipases como fator de virulência em infecções de origem microbiana já é conhecido, e a sua aplicação em processos biotecnológicos tem aumentado constantemente (JAEGER et al., 1994). As lipases estão supostamente envolvidas no processo de infecção dos insetos, pois lipídios e ácidos graxos são constituintes da cutícula dos insetos (BEYS SILVA et al., 2005).

As lipases pertencem à classe das serinas hidrolases, e ao contrário da maioria das enzimas extracelulares de origem microbiana, não necessitam da presença de cofatores para que possam atuar. São classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. São encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como os fungos (JAEGER, 1999).

Um dos principais motivos para o interesse crescente nas lipases é a versatilidade biotecnológica dessas enzimas, devido à sua capacidade de realizar hidrólise ou síntese de ésteres (JAEGER et al., 1994). As lipases de fungos, principalmente, têm sido usadas pela indústria de alimentos devido às diversificadas especificidades por substratos (JAEGER et al.,

1999; SHARMA et al., 2001; COLEN, 2006). Geralmente em escala industrial são empregadas lipases de origem microbiana, devido o custo de isolamento ser mais baixo do que as de fontes animais e vegetais.

O primeiro registro de uma levedura produtora de lipase ocorreu na metade do século passado (PETERS; NELSON, 1948). Mais recentemente as lipases de *Candida* spp apresentaram excelente capacidade de esterificação, sem demonstrar especificidade posicional para os triglicerídeos. Elas apresentam aplicação para a síntese de ésteres de cadeia curta que podem ser usados como compostos flavorizantes ou aromatizantes ou ainda como combustíveis na forma de biodiesel. Neste caso, como ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (LEE et al., 2002; TAN et al., 2003; LARIOS et al., 2004).

Lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos quando estes são cultivados em condições apropriadas, sendo facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação. Pequena quantidade de lipase tem sido encontrada dentro ou aderida ao micélio (RAPP, 1995). Entre os fungos filamentosos a lipase, como outras enzimas extracelulares, também pode estar em formas múltiplas, sendo a sua formação dependente de características de cultivo tais como composição do meio de cultura, parâmetros físico-químicos, idade do cultivo e a presença de agentes indutores ou inibidores (JACOBSEN et al., 1989; COLEN, 2006).

Muitas lipases fúngicas estão descritas na literatura, mas poucas espécies têm demonstrado estabilidade adequada e capacidade satisfatória de biocatálise para serem de relevância à aplicação industrial (MARGOLIN, 1993). Um número grande de lipases de fungos filamentosos tem sido estudado sob o ponto de vista genético e bioquímico e as melhores espécies produtoras pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (STCKLEIN et al., 1993).

## 2.8. DNA e PCR

As técnicas de diagnóstico molecular foram inicialmente utilizadas na taxonomia de microrganismos e têm sido intensamente aplicadas em programas de melhoramento genético. O objetivo destas técnicas é revelar a variabilidade em nível de DNA e, conseqüentemente, detectar diferenças entre os indivíduos (MARQUES et al., 2002).

A técnica da reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foi descrita em meados da década de 1980 por Saiki et al. (1985) e Fungaro (2000), e foi um

dos passos revolucionários na genética molecular, pois se tornou possível a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA sem a necessidade de clonar esses segmentos (ALBERTS et al., 1994). Tornou-se uma importante ferramenta para o diagnóstico de fungos, e teve um impacto muito grande porque permite inúmeras cópias de um dado segmento de DNA. Utiliza a característica da DNA polimerase de sintetizar moléculas de DNA usando um molde de DNA de fita simples a partir de uma reação de dupla fita obtida, utilizando oligonucleotídeos sintéticos, o primer (SCHRANK; VAINSTEIN, 2002).

A PCR explora as características da duplicação do DNA e consiste em desnaturar o DNA genômico, submetendo-o a uma alta temperatura e, desse modo, permitindo que as duas fitas simples originadas sejam duplicadas. Nesse ponto reside um dos trunfos dessa técnica, que é a utilização de uma enzima extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, a *Taq* polimerase. Essa bactéria habita locais quentes e sua enzima suporta temperaturas de até 94°C, sendo que sua temperatura ótima é de 72°C.

Essa peculiaridade permite que o processo seja realizado em aparelho termociclador com programas pré-estabelecidos com alterações de temperatura. Além da *Taq* polimerase, são necessários dois iniciadores de seqüência conhecida, que irão anelar-se às fitas simples do DNA em suas extremidades 3', que obviamente tenham seqüências complementares, e direcionar a polimerase na síntese da seqüência desejada. Ambas as fitas servem como moldes e o resultado de "n" ciclos de PCR é a formação de 2n duplas fitas de DNA, que são cópias da seqüência flanqueada pelos iniciadores (ALBERTS et al., 1994).

As vantagens dessa técnica são muitas, entre elas a quantidade de DNA necessária para a reação, na ordem de dezenas de nanogramas. Entre as principais utilidades da reação em cadeia da polimerase estão os estudos de evolução molecular, diferenciação de grupos taxonômicos, identificação de genes específicos, entre outras (MICHELI, 2005). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade desta técnica tornaram-na uma poderosa ferramenta em estudos genéticos que envolvem um grande número de organismos vivos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

## **2.9. Realização de bioensaios**

Dada a grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos, deve ser destacada a importância da realização de bioensaios para a seleção de isolados altamente virulentos, persistentes e com boa capacidade de produção de esporos (ALVES,

1998b; DAL BELLO et al., 2001), o que aumenta o potencial dos fungos entomopatogênicos como inseticidas microbiológicos (POTRICH et al., 2006). Algumas espécies apresentam amplo espectro de hospedeiros e alta variabilidade genética, por isso é fundamental realizar bioensaios para selecionar isolados mais virulentos às pragas-alvo (ALVES, 1998).

Entre os fatores que variam nos testes para avaliar a ação dos fungos em insetos, estão o modo de inoculação, número de insetos utilizados, viabilidade do patógeno, concentrações de conídios, período e modo de avaliação e mortalidade considerada (total, confirmada e corrigida) (BUTT; GOETTEL, 2000; SANTORO, 2007). Essas variações podem influenciar os resultados obtidos, portanto as condições de bioensaios devem estar o mais próximo possível daquelas em que o patógeno será aplicado, assim o experimento possibilitará melhor previsão do que ocorrerá em condições de campo (SANTORO, 2007).

Os fungos infectam os insetos, preferencialmente, pela superfície do tegumento (BOUCIAS; PENDLAND, 1998); em decorrência, os métodos de inoculação mais utilizados são pulverização sobre o inseto (NEVES; HIROSE, 2005; ROHDE et al., 2006), imersão do inseto na suspensão (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005) e tratamento da superfície com suspensão de conídios (BATISTA FILHO et al., 1992; EMBRAPA, 2010).

Neste sentido, há grande relevância para a identificação de microrganismos que possam ser utilizados em programas de biocontrole nas mais diversas áreas do conhecimento, e que possam favorecer resultados altamente significativos a nível ambiental. Os programas de controle biológico no Brasil proporcionam redução considerável de produtos químicos nas lavouras, e evidenciam grande aderência dessa biotecnologia pelos agricultores das regiões tradicionais de produção de alimentos.

A Amazônia é um ecossistema de grande diversidade, e os Estados que a formam possuem clima altamente diferenciado do resto do Brasil. É provável que neste habitat muitos microrganismos ainda não identificados estejam para ser descobertos, especialmente porque essas condições ambientais são ideais para o desenvolvimento de várias espécies de patógenos.

O Território da Transamazônica e Xingu, no Estado do Pará, é formado pelos municípios de Pacajá, Anapú, Altamira, Vitória do Xingu, Brasil Novo, Medicilândia, Uruará, Placas, Senador José Porfírio e Porto de Móz, de acordo com o Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA). Na maioria destes municípios a cultura do cacaueteiro tem destaque na preferência dos agricultores, mas todos apresentam pecuária forte e sofrem com problemas de pragas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Localização e características das áreas de coleta

A pesquisa de campo foi realizada no Território da Transamazônica e Xingu, Estado do Pará, em culturas de cafeeiro e cacaueteiro, pastagens e capoeiras em propriedades rurais ao longo da Rodovia BR 230, no sentido Altamira-Itaituba, nos municípios de Altamira, Brasil Novo e Medicilândia, conforme Figura 2.

Os ecossistemas escolhidos para as coletas de insetos apresentam as seguintes características: as culturas regionais são áreas de atividade agrícola, e, portanto, sujeitas ao manejo intensivo do homem; as pastagens constituem as maiores áreas cultivadas na região e as capoeiras, constituem-se na vegetação que substitui as áreas desmatadas ou pastagens degradadas.

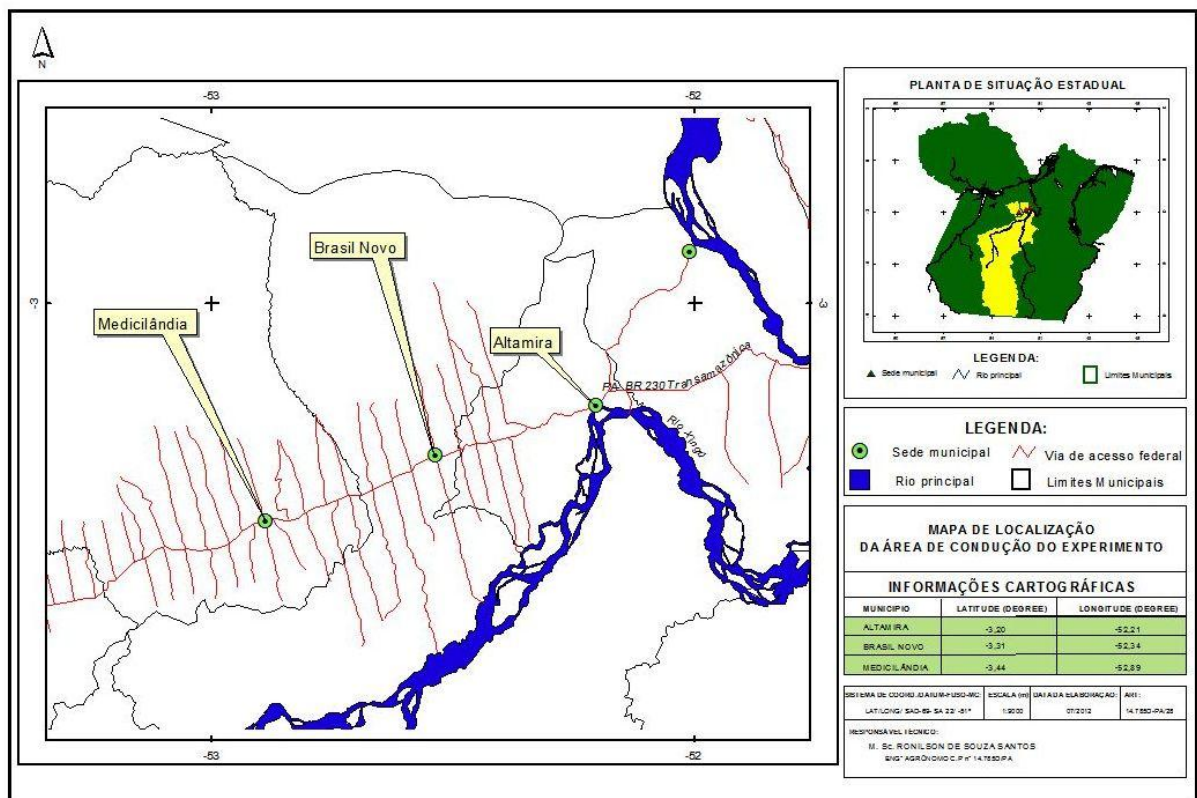


Figura 2. Mapa de localização das áreas de coleta de insetos e solo: Altamira, Brasil Novo e Medicilândia. Altamira, Pará, 2012.

### 3.2. Procedimentos de coleta de insetos e solo

Os principais pontos observados para a coleta de insetos parasitados foram copa das plantas, caules inteiros ou atacados e na superfície do solo. Foram capturados de populações naturais, insetos vivos e/ou mortos, pupas e adultos. Os isolados dos fungos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de exemplares de insetos sadios e parasitados, durante o período de setembro/2009 a abril/2012. Os insetos parasitados encontrados foram colocados em placa de Petri.

Os insetos aparentemente sadios da praga broca-do-café e *M. annulipes* foram capturados em plantações de cafeeiro e cacauzeiro, respectivamente, e colocados em recipientes plásticos adaptados (Figura 3) para sua criação e análise de comportamento. Esses foram levados para o laboratório e alimentados por 10 dias com café, no caso da broca, e brotações novas e cacau, no caso do monalônio do cacauzeiro, com o objetivo de identificar possíveis patógenos colonizando essas pragas nas condições de campo.

As amostras de solo foram coletadas onde os insetos parasitados foram encontrados, sendo colhidas em 5 pontos em profundidade até 10 centímetros, abaixo e ao entorno das árvores que hospedavam os referidos insetos nas plantações de cafeeiro e cacauzeiro. As amostras colhidas foram colocadas em sacos de papel e numeradas individualmente.

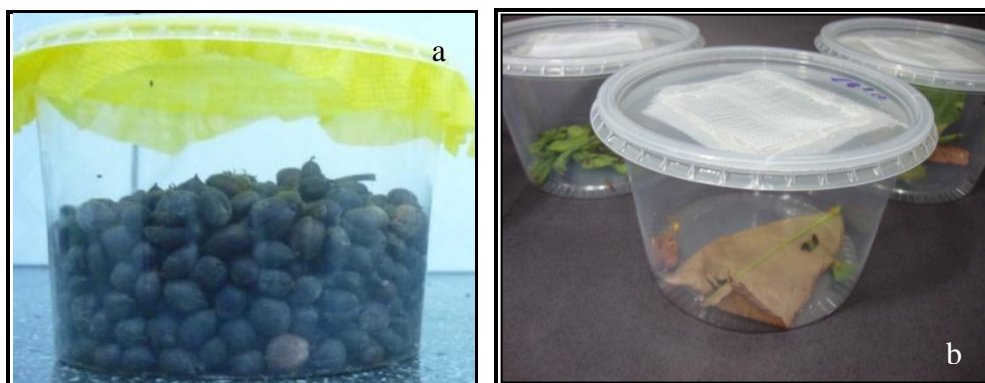


Figura 3. Recipientes usados na criação em laboratório da (A) *H. hampei* e (B) *M. annulipes*. Altamira, Pará, 2012.

As amostras de insetos e solo coletados foram levadas para o Laboratório de fitopatologia da Faculdade de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira para o isolamento e identificação dos fungos.

### **3.3. Isolamento e armazenamento de fungos**

Depois de coletados os exemplares de insetos foram conduzidos ao laboratório para o devido registro, isolamento, purificação dos fungos e a posterior identificação taxonômica dos insetos. Após o isolamento, para facilitar a manipulação e os ensaios posteriores, identificou-se cada isolado obtido com uma sigla com relação à cultura da qual o fungo foi proveniente.

As culturas foram mantidas em tubos contendo 5 mL de BDA inclinado com pH 6,8 (Infusão 200 g de batatas, 20 g Dextrose, 15 g Ágar e Água destilada qsp 1 L). Após inoculação e incubação a 28°C por 10 dias, as culturas foram estocadas em refrigerador a 4°C durante 30 a 60 dias. Passado este período, procedeu-se uma nova repicagem. Os isolados de fungos foram também conservados por meio do método descrito por Castellani (1939) e método do óleo mineral.

#### **3.3.1. Isolamento de fungos a partir de insetos – superfície**

De acordo com o estado em que os insetos foram encontrados, efetuou-se ou não a sua lavagem em água destilada esterilizada. Em seguida com auxílio de uma alça de níquel cromo, devidamente flambada, procedeu-se à remoção das partes aéreas dos fungos, inoculando-as em placas de Petri contendo BDA, ao qual foi adicionado antibiótico (tetraciclina 100 mg/L e ou estreptomicina 100 mg/L). As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias. Utilizou-se a técnica de obtenção de colônias monospóricas, para se obter uma nova colônia a partir da germinação de um único conídio. Utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de Azevedo e Costa (1973). Após diluições, ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), semeou-se 50  $\mu$ L de cada diluição em triplicata, em placas com meio BDA e após crescimento retirou-se uma colônia oriunda de um único conídio. As placas com colônias foram armazenadas em incubadora tipo BOD a 28°C até esporulação, para depois serem estocadas (MONTEIRO, 1988).

#### **3.3.2. Isolamento de fungos a partir de insetos - interno**

O isolamento foi efetuado a partir da desinfecção do tegumento do inseto morto em solução de hipoclorito de sódio (3% de cloro ativo) durante 3 minutos. A seguir, lavou-se o



inseto em solução salina. Após esta preparação, o inseto foi cortado e esmagado em placa de Petri esterilizada com papel de filtro no fundo, e os fragmentos transferidos para placas com BDA contendo antibióticos (MONTEIRO, 1988). Em seguida, incubou-se por 10 dias a 28°C. Para o isolamento e purificação desses fungos utilizou-se a técnica de obtenção de colônias monospóricas. Os isolados foram em seguida estocados em tubos de ensaio inclinado contendo meio de cultura (BDA).

### **3.3.3. Isolamento de fungos a partir de solo**

O isolamento de fungos do solo foi realizado segundo o protocolo de Ferreira (2009) (comunicação pessoal): Pesou-se 10 g de solo em frasco autoclavado, adicionou-se 90 mL de PBS (Tampão fosfato) e agitou-se a 150 rpm, em temperatura constante de 28°C por 1 hora. Após esses procedimentos fez-se as diluições na base 10 ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), plaqueou-se 100 µL das diluições em três (3) placas com BDA (Batata, Dextrose e Agar) e três (3) com meio de Martin (Peptona-15 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,5 g;  $K_2HPO_4$ -1 g; Ágar-20 g, Rose bengal-35 mg; Água- qsp 1 litro). O pH foi ajustado para 6,5. O meio foi suplementado com antibióticos (100 mg/L de tetraciclina e estreptomicina). As placas foram incubadas em BOD a 28°C até as avaliações das colônias que foram feitas a partir do 7º ao 10º dias. As colônias foram repicadas e identificadas.

### **3.4. Avaliação do crescimento vegetativo**

Para a avaliação do crescimento vegetativo dos isolados, utilizou-se a mesma metodologia utilizada por Almeida et al. (2003) e Monteiro et al. (2004). O cultivo foi realizado em placas de Petri de 12 x 80 mm, contendo 15 mL de meio BDA, a inoculação foi efetuada com agulha de níquel-cromo mediante repicada, transferindo-se esporos e fragmentos de micélio para o ponto central das placas. Após inoculação, o fungo foi incubado em BOD a 28°C, por 10 dias em fotofase de 12 horas. A avaliação do crescimento radial da colônia foi realizada com régua milimétrica, medindo-se todos os dias dois diâmetros ortogonais e retirando-se a média das duas medidas. Foram feitas 5 repetições por isolado.

### 3.5. Os Bioensaios

#### 3.5.1. Monalônio

Com a finalidade de verificar se o isolado obtido era ou não patogênico ao inseto, inoculou-se em exemplares de insetos adultos e ninfas de monalônio suspensão de esporos do isolado Icac 3.

O isolado foi cultivado em meio BDA durante 10 dias, em seguida os conídios foram transferidos para água destilada com tween 80 (0,1% v/v), quantificados em câmara de Neubauer e a suspensão foi padronizada em  $1 \times 10^8$  conídios/mL do isolado. A suspensão foi inoculada em frasco de Erlenmeyer com 100 g de arroz parbolizado, umedecido com 50 mL de água destilada e devidamente autoclavado.

Após inoculação, o frasco com arroz foi colocado em incubadora tipo BOD a 28°C durante 10 dias. Depois de o isolado ter esporulado, pesou-se 1,0 g de arroz, adicionou-se a um Becker contendo 100 mL de água destilada autoclavada com 0,15 mL de Tween 80, sendo a seguir agitados em vortex, e o número de esporos foi estimado em câmara de Neubauer, de acordo com Alves e Moraes (1998), na concentração de  $10^8$  esporos/mL.

Foram utilizados 50 insetos vivos, distribuídos em 5 recipientes plásticos com 10 insetos em cada um (Figura 4). Esse isolado foi pulverizado com suspensão de esporos e colocado em recipientes com folhas e frutos de cacauero. Os recipientes foram mantidos em uma sala, com temperatura controlada entre 27 e 28°C. As avaliações foram feitas diariamente após a montagem do bioensaio. Os insetos mortos foram transferidos para câmaras úmidas, mantidas em iguais condições, para verificar a emergência do fungo. Alguns insetos foram transferidos individualmente para tubos de ensaio esterilizados que foram conservados em refrigerador, para posterior reisolamento.



Figura 4. Bioensaio do monalônio com o isolado encontrado colonizando insetos no Território da Transamazônica e Xingu, Altamira, 2012.

### 3.5.2. Broca-do-café

Com a finalidade de verificar se os diversos isolados, obtidos de acordo com o item anterior, eram ou não patogênicos a insetos, inoculou-se em adultos de *H. hampei* suspensão de esporos de cada isolado. Os isolados foram cultivados em BDA durante 10 dias, em seguida os conídios foram transferidos para água destilada com tween 80 (0,1% v/v), quantificados em câmara de Neubauer e a suspensão foi padronizada em  $1 \times 10^8$  conídios/mL de cada isolado. A suspensão foi inoculada em frascos de Erlenmeyer com 100 g de arroz parbolizado, umedecido com 50 mL de água destilada e devidamente autoclavado.

Após inoculação, os frascos com arroz foram colocados em incubadora tipo BOD a 28°C durante 10 dias. Depois de o isolado ter esporulado, pesou-se 1,0 g de arroz, adicionou-se a um Becker contendo 100 mL de água destilada autoclavada com 0,15 mL de Tween 80, sendo a seguir agitados em vortex, e o número de esporos foi estimado em câmara de Neubauer de acordo com Alves e Moraes (1998), na concentração de  $10^8$  esporos/mL.

Foram utilizados 350 insetos vivos, distribuídos em 5 recipientes plásticos com 10 insetos em cada um, totalizando 50 insetos, conforme Figura 5. Esses insetos foram pulverizados com suspensão de esporos e colocados em recipientes com café triturado. Os recipientes foram mantidos em BOD a 28°C. As avaliações foram feitas diariamente após a montagem do bioensaio, verificando-se as câmaras úmidas. Os insetos mortos foram transferidos para novas câmaras, mantidas em iguais condições, para verificar a emergência do fungo. Alguns insetos foram transferidos individualmente para tubos de ensaio esterilizados que foram conservados em refrigerador, para posterior reisolamento.



Figura 5. Bioensaio da broca-do-café com os isolados encontrados colonizando insetos no Território da Transamazônica e Xingu. Altamira, Pará, 2012.

Com a finalidade de se ter maior segurança de que a morte dos insetos foi causada pela exposição ao isolado, procedeu-se o reisolamento do fungo utilizando-se os insetos conservados em tubos no refrigerador. Para isso, foi feita a desinfecção do tegumento do

inseto morto em solução de hipoclorito de sódio a 3%, durante 3 minutos, lavando em seguida em solução salina. Após, o inseto foi fragmentado em placa de Petri esterilizada contendo papel de filtro no fundo. Os fragmentos foram transferidos para placas com BDA mais antibióticos. Essas placas foram incubadas por 10 dias a 28°C, observando-as assim o crescimento ou não do fungo.

### **3.6. Identificação dos isolados de fungos**

#### **3.6.1. Pelo método clássico**

Para a identificação dos fungos isolados de insetos foi adotada a metodologia do manuseio de chaves taxonômicas descritas por Alexopoulos (1996) e Alves (1998), chave para os principais gêneros de fungos entomopatogênicos.

#### **3.6.2. Pelo método molecular**

A identificação molecular foi realizada no laboratório de genética de microrganismos do departamento de genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ-USP. Para a extração de DNA, foi utilizado o meio de cultura BD (Batata e dextrose) que foi distribuído em 13 frascos de Erlenmeyers de 250 mL, cada um com 50 mL de meio. Inoculou-se 2 discos de 2 cm dos 13 isolados dos insetos parasitados e do solo, incubou-se durante 05 dias sob agitação de 150 rpm a 28°C. Após 5 dias esse meio de cultura passou para a filtração em bomba de vácuo, e colocados no freezer a -20°C para posterior extração.

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído de acordo com Raeder & Broda (1985). As regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s, e uma extensão final a 72°C por 7min. Foram utilizados os primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50µL, contendo Tampão 1x (50mM de KCl, 20mM de Tris-

HCl (pH 8,4), 3,7mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de dNTP, 0,05U.µL<sup>-1</sup> de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4µM de cada primer e 3ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado após eletroforese em gel agarose 1,2% a 3 volts.cm<sup>-1</sup>, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1 Kb (Fermentas). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados a partir de um protocolo que utiliza PEG 8000 (Polietileno Glicol) (2 g de acetato de sódio, 1,2 g de Mg Cl 2 x 6 H 2 O e 262,0 g de PEG, 49,2 g de acetato de sódio, 1,2 g de Mg Cl 2 x 6 H 2 O e 262,0 g de PEG 8000) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de agitação em vórtex e centrifugados por 15 minutos (10.000g). O sobrenadante foi removido e adicionados 100 µl de etanol 95 – 100%. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000g, foi removido o sobrenadante e os tubos foram secos em temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em água ultrapura autoclavada em um volume de 20 µl. Após este procedimento as amostras purificadas foram verificadas em gel 1,2% de agarose e quantificadas com DNA lambda com diferentes concentrações para a quantificação que foi padronizada em 20 ng/µl e foram enviadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, Setor de Sequenciamento de DNA-Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo-USP.

Para a identificação dos isolados fúngicos, as sequências foram analisadas comparativamente por meio do NCBI via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor escore de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. Dessa forma, considerou-se as sequências que apresentaram os mais altos valores de similaridade. Foram considerados os isolados fúngicos em nível de gênero.

### **3.7. Avaliação da atividade enzimática**

Para o crescimento dos diferentes isolados e a indução da atividade enzimática utilizou-se o Meio Mínimo (NaNO<sub>3</sub> - 6 g; KCl - 0,5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g; ZnSO<sub>4</sub> - traços; FeSO<sub>4</sub> - traços; Agar - 15 g; 1.000 mL de água destilada, o pH foi corrigido para 6,8). Para a indução de cada enzima foi adicionado separadamente o substrato adequado, em concentração final de 1,0%. Após esse processamento, o meio foi acondicionado em recipiente de vidro e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Os meios de cultura foram

distribuídos em placas de Petri (90x15 mm). Após solidificação inoculou-se os isolados com um disco de micélio-ágar de aproximadamente 2 cm. Esses isolados foram incubados em BOD por 7 dias a 28°C. Para as atividades enzimáticas testadas, os isolados cresceram em placas com meio BDA, exceto para quitinase.

Os substratos utilizados para o crescimento dos isolados foram amido, pectina, carboximetilcelulose, lipase (*tween* 20) e quitina. As enzimas trabalhadas foram amilase, pectinase pH 5,0 e pectinase pH 8,0, celulase, lipase e quitinase. Apenas para a atividade enzimática da quitinase foi utilizado meio líquido. Neste experimento foram utilizados 13 isolados, sendo 7 encontrados em insetos e 6 no solo das áreas onde foram localizados, com 3 repetições e 5 enzimas, totalizando 195 placas de Petri com meio sólido e 24 frascos de Erlenmayer com meios líquidos, sendo 3 controles.

Para a atividade amilolítica foi acrescido ao MM 1,0% de amido e incubados por 7 dias a 28°C. Após o período de crescimento as placas foram coradas com 2 mL de solução de Lugol por 10 minutos, constituído por Iodo ( $I_2$ ) - 50 g, Iodeto de potássio (KI) - 100 g e Água destilada - 1000 ml. Para a atividade celulolítica foi acrescido ao MM 1,0% de carboximetilcelulose e incubados por 7 dias a 28°C. Após o período de crescimento foi procedido a coloração, foi adicionado 10 mL de solução corante de vermelho congo 0,1%, constituído de vermelho congo - 0,1 g e água destilada - 100 mL. Após 15 minutos a solução de vermelho congo foi descartada e a placa lavada com 3 mL de solução de NaCl 0,5 M. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos.

Para a atividade pectinolítica foi acrescido ao MM 1,0% de pectina em pHs 5,0 e 8,0 incubados por 7 dias a 28°C. Após o período de crescimento as placas foram coradas com 2 ml de solução Lugol constituído de Iodo ( $I_2$ ) - 50 g, Iodeto de potássio (KI) - 100 g, Água destilada 1.000 ml. Para a atividade lipolítica foi acrescido ao MM contendo 1,0% de tween e incubados por 7 dias a 28°C. Após esse período de crescimento as placas foram colocadas em refrigerador por duas horas para visualização de cristais que formam o halo ao redor da colônia. Os diâmetros das colônias e dos halos foram medidos.

Na avaliação da atividade quitinolítica foi utilizado o meio BD (batata contendo apenas 10,0% de dextrose) acrescido de quitina (Quitina grau prático obtida de carapaça de caranguejo SIGMA- ALDRICH). Em frascos de Erlenmeyers de 125 mL foram distribuídos 10 mL de meio BD e 0,1 g de quitina. Para cada isolado analisado foi inoculado um disco de 2 cm, com 3 repetições e incubados em agitador orbital (150 rpm) por 5 dias a 28°C. Para o controle foram incubados 3 frascos de Erlenmeyers contendo apenas o meio de cultura com quitina. Após 5 dias de incubação os fungos foram centrifugados e coletados os sobrenadantes

e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação. Para a quantificação foram coletados 75  $\mu\text{l}$  do meio onde os isolados cresceram e colocados em microtubos limpos e adicionado 25  $\mu\text{l}$  do substrato CM-Chitin-RBV e incubados a  $45^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Após 2 horas foram adicionados 25  $\mu\text{l}$  de HCl 2N, para parar a reação e os microtubos foram colocados em congelador por 10 minutos. Após este período os microtubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos e 100  $\mu\text{l}$  deste sobrenadante foram colocados em cubetas para realizar a leitura em Espectrofotômetro, no comprimento de ondas de 550 nm. A curva de padronização foi realizada utilizando-se diferentes concentrações de quitina.

### **3.8. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAS. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, utilizando-se o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparação das médias.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Insetos colonizados e fungos de solo**

Foram encontrados insetos parasitados por fungos em frutos e ramos do cafeeiro e cacauero, como pode ser observado na Figura 6. No cafeeiro foram obtidos isolados de fungos de uma mariposa do gênero *Eudocima*, perfuradora de frutos comum nas plantações de cafeeiro e também em brocas-do-café (*H. hampei*), praga de importância regional. Em cacauero foram obtidos percevejos da ordem Hemiptera, que devido seu estado de deterioração não foram precisamente identificados, bem como percevejos da ordem Hemiptera, família Miridae e espécie *M. annulipes*, considerado atualmente a principal praga da lavoura em Medicilândia. Os fungos obtidos encontram-se na Tabela 1.

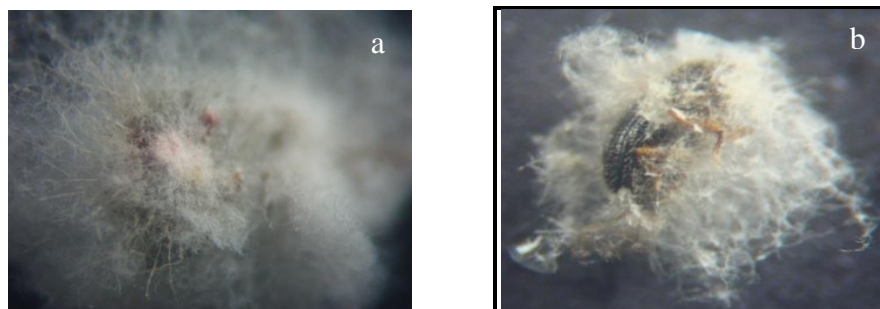


Figura 6. Insetos colonizados: a) *Monalonium annulipes* e b) *Hypothenemus hampei*. Altamira, Pará, 2012.

Os isolados encontrados em solo, coletados abaixo das plantas hospedeiras de insetos colonizados por fungos nas culturas de cafeeiro e cacaueteiro, estão apresentados na Tabela 1. De acordo com a análise morfológica, observou-se a ocorrência dos gêneros *Rhinochlaidiella* spp., *Cladosporium* spp., *Verticillium* spp. e *Pseudallescheria* spp.

Tabela 1. Isolados de fungos obtidos de insetos e solo encontrados em plantas do cafeeiro e cacaueteiro no Território da Transamazônica e Xingu, Pará, 2012.

<b>Isolados</b>	<b>Insetos/Solo</b>	<b>Hospedeiro</b>
Icaf 1	<i>Eudocima</i> spp.	cafeeiro
Icaf 2	<i>Hypothenemus hampei</i>	cafeeiro
Icaf 3	<i>Hypothenemus hampei</i>	cafeeiro
Icaf 4	<i>Eudocima</i> spp.	cafeeiro
Icac 1	Hemiptera	cacaueteiro
Icac 2	Hemiptera	cacaueteiro
Icac 3	<i>Monalonium annulipes</i>	cacaueteiro
Scac 1	Solo	cacaueteiro
Scac 2	Solo	cacaueteiro
Scaf 1	Solo	cafeeiro
Scaf 2	Solo	cafeeiro
Scaf 3	Solo	cafeeiro
Scaf 4	Solo	cafeeiro

#### 4.2. Identificação dos isolados de fungos obtidos de insetos parasitados

Os fungos isolados dos insetos mortos ou moribundos foram identificados por meio de observações das características morfológicas das colônias e das estruturas reprodutivas dos fungos (Figura 7). Entre os gêneros identificados observou-se o *Penicillium* com maior ocorrência, além de *Hyphopichia*, *Verticillium* e *Fusarium*.



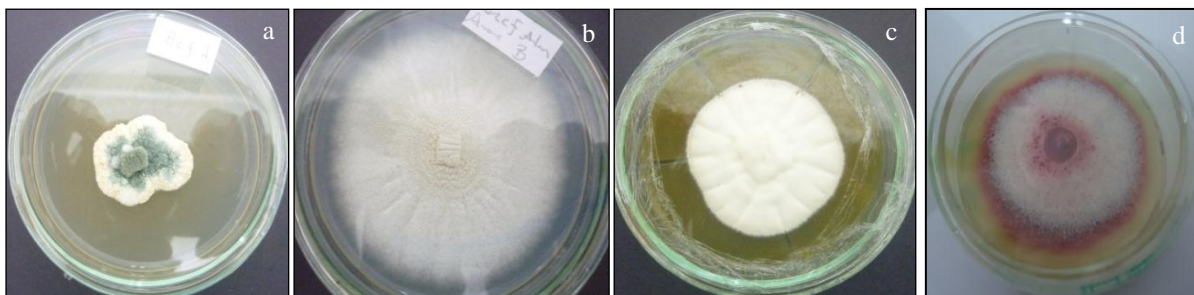


Figura 7. Colônias de a) *P. citrinum* , b) *H. burtonii* , c) *Verticillium* spp. e d) *Fusarium* spp.

Diversos autores registraram a presença de diferentes gêneros de fungos associados à broca-do-café em frutos de cafeeiro. Os gêneros mais frequentes foram *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Hirsutella* e *Paecilomyces* (CARRIÓN; BONET, 2004). PÉREZ et al. (2003) registraram 18 gêneros de fungos filamentosos associados ao corpo da broca-do-café. No México foi encontrada uma nova espécie de *Penicillium*, descrita como *Penicillium brocae* associada a essa broca, em plantações daquele país (PETERSON et al., 2003).

Pesquisadores da Embrapa Rondônia têm observado em cafezais de diversos municípios daquele Estado, a ocorrência do fungo *B. bassiana* fazendo o controle da broca-do-café. Consideraram ainda, ser comum encontrá-lo envolvendo brocas mortas no interior dos frutos (EMBRAPA, 2005).

As análises de taxonomia tradicional mostraram que os isolados Icaf 1, Icaf 4 e Icac 2, sendo os dois primeiros encontrados em insetos provenientes do cafeeiro e o último parasitando inseto encontrado no cacaueteiro, mostraram características macro e microscópicas semelhantes às encontradas para o fungo filamentoso *Penicillium citrinum*. Os conídios apresentaram coloração verde escuro e formato esférico, verso da colônia apresentam coloração creme amarelado, micélio branco, conidiogênese moderada, colônias radialmente sulcadas e centralmente flocosas. Com relação às análises microscópicas o isolado Icac 1 foi identificado como *Verticillium* sp apresentou-se as seguintes características morfológicas: conídios de forma elíptica, apresentando fiálides pontiagudas na extremidade, saindo da haste principal do conidióforo. No Brasil esse fungo foi detectado pela primeira vez atacando *Cinara pinivora* (WILSON, 1919) em 1996, infestando plantios de *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* em Camará do Sul, RS, e Lages, SC (IEDE et al.; 1998; PENTEADO et al.; 2001).

Pela análise molecular os isolados Icaf 1, Icaf 4 e Icac 2 apresentaram uma similaridade de 97%, 100% e 99% com a espécie de *Penicillium citrinum*, conforme apresentado na Tabela 2. O isolado Icac 1, encontrado parasitando percevejo Hemiptera do cacaueteiro apresentou, pela análise molecular, uma similaridade de 100% com o fungo

entomopatogênico *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (Zimm.) Viègas (Classe: Hyphomycetes) (Tabela 02).

O isolado leveduriforme *H. burtonii* encontrado nesse trabalho também foi coletado na Tailândia parasitando insetos de capim, identificados por análises morfológica, bioquímica fisiológica e molecular (LIMTONG et al., 2012).

Os isolados Icaf 2 e Icaf 3, pela análise molecular apresentaram similaridade de 97% e 95%, respectivamente com o fungo *Hyphopichia burtonii* (Tabela 02). Os dois isolados foram encontrados colonizando a broca-do-café. O isolado Icaf 5 também encontrado colonizando a broca-do-café não foi identificado pelo método molecular, no entanto pela análise clássica ele apresentou-se com características do gênero *Penicillium*.

No Brasil os fungos que ocorrem naturalmente nas lavouras do cafeeiro são *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Verticillium lecanii*, atingindo a broca-do-café, cochonilhas, bicho-mineiro e cigarras, sendo agentes de controle biológico importantes para essas pragas, mantendo suas populações em níveis de danos não-econômicos. *Lecanicillium*(=*Verticillium*) *lecanii* ocorre causando epizootia em populações de citros e principalmente sobre *Coccus viridis* em cafeeiro (ALVES et al., 1998; BUSTILLO et al., 1999; BERNAL et al., 1999; ALMEIDA et al., 2003).

Tabela 2. Identificação molecular dos isolados de fungos obtidos de insetos e solo encontrados em plantas do cafeeiro e cacauero no Território da Transamazônica e Xingu. Altamira, Pará, 2012.

<b>Isolados de inseto</b>	<b>Seqüenciamento Blast-n</b>	<b>Máxima Identidade %</b>
Icaf 1	<i>Penicillium citrinum</i>	97
Icaf 2	<i>Hyphopichia burtonii</i>	97
Icaf 3	<i>Hyphopichia burtonii</i>	95
Icaf 4	<i>Penicillium citrinum</i>	100
Icac 1	<i>Verticillium</i> sp	100
Icac 2	<i>Penicillium citrinum</i>	99
<b>Isolados de Solo</b>	<b>Sequenciamento Blast-n</b>	<b>Máxima Identidade %</b>
Scac 1	<i>Rhinocladiella</i> sp.	99
	<i>Cladosporium</i>	
Scac 2	<i>sphaerospermum</i>	99
Scaf 1	<i>Verticillium</i> sp.	98
Scaf 2		
Scaf 3	<i>Pseudallescheria boydii</i>	97
Scaf 4		

Em 1963, Gonçalves verificou o parasitismo de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha: Ortheziidae) por *Fusarium* sp., *Verticillium lecanii* e *Cladosporium* sp. reduzindo populações deste inseto para níveis não econômicos. Prates (1980) também relatou a presença destes fungos, exceto o *Fusarium*, atacando a mesma praga, mas relatou ainda presença de *Colletotrichum gloesporioides* (GARCIA, 2004).

Em pomares cítricos, no Estado do Pará, foram identificados os fungos entomopatogênicos *Aschersonia aleyrodes*, *Fusarium* sp, e *Aegerita webberi* sobre ninfas de *Aleurocanthus woglumi* (BATISTA et al., 2002) . Em São Paulo, no município de Artur Nogueira, o Instituto Biológico detectou a presença do fungo *A.aleyrodes* atacando ninfas de *A. woglumi* em condições favoráveis de epizootia (RAGA; COSTA, 2008, citado por SILVA et al., 2011).

#### 4.3. Identificação dos isolados de fungos de solo

De acordo com a análise molecular, observou-se a ocorrência de alguns gêneros de fungos dentre os quais *Rhinoctadiella*, *Cladosporium*, *Verticillium* e *Pseudallescheria*. O isolado Scaf 1 foi identificado através de análise molecular com 98% de similaridade com o gênero *Verticillium* (Tabela 02). Estudos realizados no México por Rodrigues-Guzman (2001), com patógenos de plantas atuantes na rizosfera, identificaram como os gêneros freqüentemente mais encontrados o *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium* e *Botrytis*. SIQUEIRA et al. (1999), observaram maior freqüência dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* no solos de cafezais.

Através de análises moleculares o isolado Scac 2, encontrado no solo de lavoura cacaueteira, apresentou com o fungo *Cladosporium sphaerospermum* similaridade de 99% (Tabela 02). Este fungo é uma espécie bastante comum e semelhante ao *Cladosporium cladosporioides*, sendo uma característica definitiva entre as duas espécies o formato dos conídios que, nos isolados associados ao cafeeiro é característico, elipsoidal ou limoniforme, sendo raramente encontrado conídios com formato globoso ou subgloboso.

Analisando fungos do Latossolo Amarelo e Terra Preta de Índio em várias localidades da Amazônia Oriental, Batista et al. (2002) isolaram e identificaram os gêneros *Mixotrichum*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Sporothrix*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

*Cladosporium* é um dos gêneros de fungos mais comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo. O fungo é encontrado como saprófita, contaminante do ar e alimentos, endofítico, com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica, sendo também forte competidor com outros microrganismos (DOMSCH et al., 1993; ELLIS, 1971; SAMSON et al., 2000; PEREIRA et al., 2005).

De acordo com Azevedo (2006) a natureza da comunidade vegetal regula a fonte de nutrientes para a biomassa e contribui para o acúmulo de matéria orgânica que difere diretamente na diversidade de microrganismos no solo. O manejo e as características físico-químicas também causam diferenças. Isso ocorreu nas duas áreas estudadas neste trabalho, onde se observou a diferença entre a ocorrência de populações fúngicas.

Nas análises realizadas observou-se um grande número de actinomicetos e bactérias, concordando com AZEVEDO (2006), que considera que esse fato faz com que haja uma maior competição e com isso os fungos sofrem redução. BURGESS (1971) e AZEVEDO (2006) citam os estudos clássicos realizados por Warcur (1955, 1957), que constataram que a maioria das colônias fúngicas que se desenvolveu nas placas com diluições de amostra de solos, se desenvolveram a partir de esporos. Estudos comparativos demonstraram que diluições de solos em placas perdem um grande número de fungos, sendo que muitos desses estão presentes no solo na forma de hifas. Mesmo com este entrave a metodologia ainda é bastante utilizada em pesquisas de microbiologia do solo (AZEVEDO, 2006).

Outros gêneros de fungos foram encontrados em amostras de solo, são eles Scac 1, de solo de cacaueteiro, com 99% de similaridade com *Rhinochloidiella* sp, e Scaf 2, Scaf 4 e Scaf 3, encontrados em solo de cafeeiro, mas apenas o último foi identificado com 97% de similaridade como fungo *Pseudallescheria boydii* (Tabela 02). O fungo *Pseudallescheria boydii* é um saprófita do solo com distribuição global, o isolamento do mesmo tem sido feito a partir de cursos de águas poluídas, esterco de aves e bovinos e lama de esgoto, sem apresentar importância econômica.

#### **4.4. Crescimento vegetativo dos isolados encontrados nos insetos e nos solos**

Nas avaliações do crescimento das colônias dos isolados dos fungos em meio BDA, observou-se que os isolados de maior crescimento foram os do Icaf 4 (1,52 cm) e Icaf 1 (1,44 cm) e o de menor, o Icaf 3 (0,56 cm). Os isolados Icaf 4 e Icaf 1 são do gênero *Penicillium* (*P. citrinum*) e o isolado Icaf 3 é do gênero *Hyphopichia* e espécie *H. burtonii*.

Com relação ao crescimento dos fungos isolados de solo, observou-se que as maiores colônias foram do Scaf 4 e Scaf 3 com diâmetros de 2,36 cm e 2,34 cm, respectivamente, e a menor colônia foi a do Scac 1 com diâmetro de 1,28 cm. O isolado Scaf 3 é do gênero *Pseudallescheria*, espécie *P. boydii*, e o Scac 1 pertence ao gênero *Rhinocladiella*, espécie *Rhinocladiella* sp .

Os isolados de insetos Icac 2, Icaf 5, Icaf 3 e Icac 1, no geral, apresentaram crescimentos reduzidos em relação a todos os outros avaliados. Considerando que todos foram colocados para crescer em fotófase de 12 horas e temperatura constante de 28°C, Monteiro (2004) observou que os isolados JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii* apresentaram melhor crescimento em ausência de luz, com diâmetro de colônias maiores. A fotófase de 12 horas ocasionou redução do crescimento e a maior redução foi observada na presença de luz constante. Para Monteiro (2004) o crescimento dos isolados avaliados foi melhor nas temperaturas de 19, 22 e 25°C em relação ao crescimento obtido na temperatura de 28°C. Nesse sentido, os resultados encontrados no trabalho com relação ao crescimento do fungo entomopatogênico *Verticillium* sp. (Icac 1), está de acordo com diversos autores (MONTEIRO et al., 2004; LI et al., 1991; VERHAAR; HYJWEGEN, 1993; HANLON et al., 1994), pois verificaram que na temperatura de 28°C ocorreu redução no crescimento dos entomopatógenos.

#### **4.5. Atividade enzimática dos isolados**

Os resultados das atividades enzimática dos isolados de fungos para avaliar a degradação dos substratos amido, CMC, *Tween* 20, pectina (pH 5 e pH 8) e quitina foram analisados e podem ser visualizados na Figura 8.

O resultado da análise da atividade amilolítica dos isolados consta na Tabela 3 e Anexo A, onde se observa que as degradações do amido apresentaram diferença significativa a 5% de probabilidade e CV=0.50. Assim, o teste de Tukey formou dois grupos estatisticamente distintos e evidenciou que os isolados Icaf 4 e Icac 2 do grupo “a”, ambos pertencem ao mesmo gênero, apresentaram as maiores atividades enzimáticas nesse substrato, já os outros isolados apresentaram atividades iguais e menores.

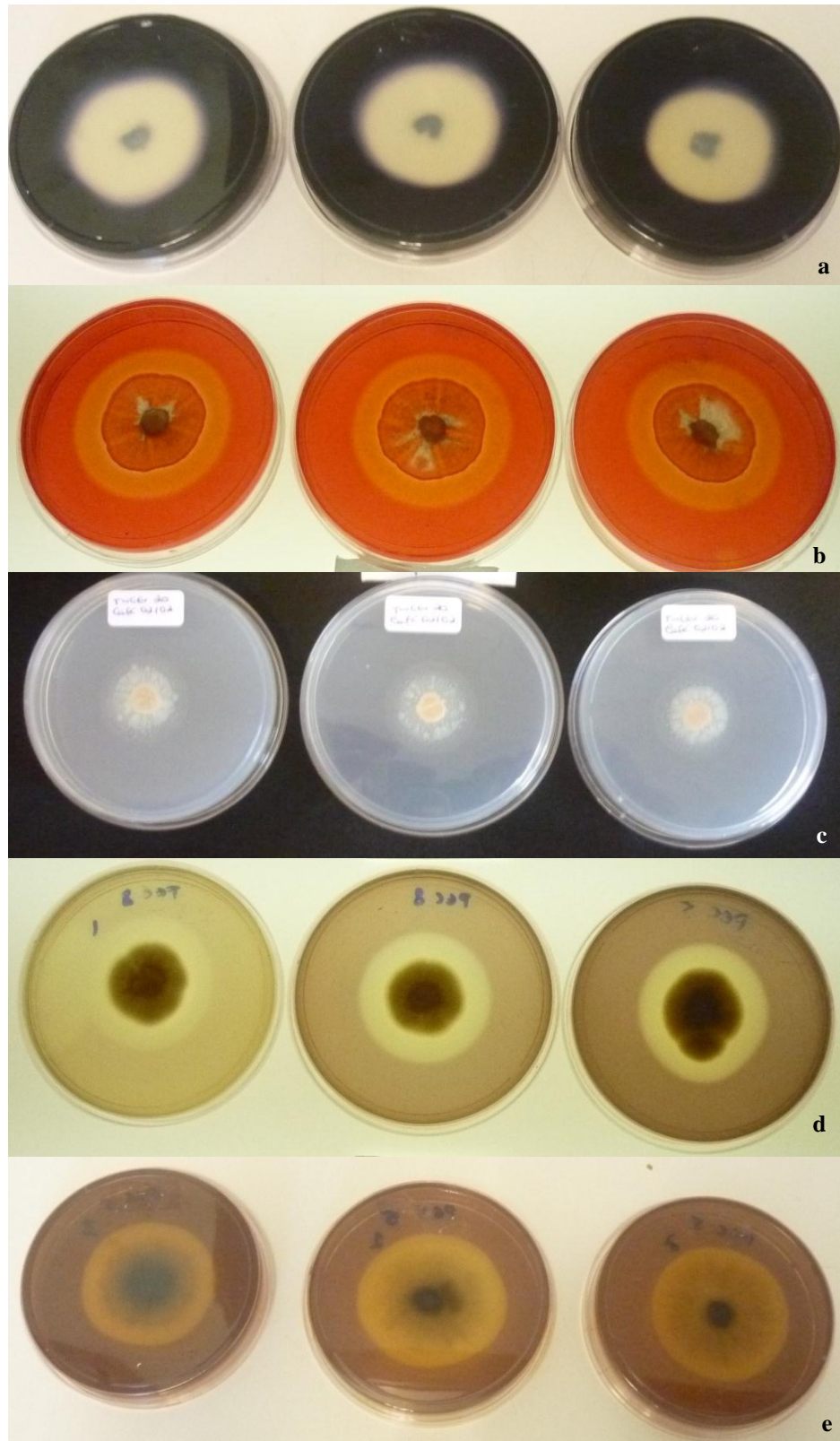


Figura 8. Formação de halos pelos isolados nos substratos: a) amido, b) CMC, c) tween 20, d) pectina pH 5 e, e) pectina pH 8. Altamira, Pará, 2012.

Tabela 3. Médias de índice de atividade amilolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias	Tukey*
Icaf 4	1,11528	a
Icac 2	1,10013	a
Icaf 1	1,00000	b
Icaf 5	1,00000	b
Icaf 3	1,00000	b
Icaf 2	1,00000	b
Icac 1	1,00000	b
Scac 1	1,00000	b
Scac 2	1,00000	b
Scaf 1	1,00000	b
Scaf 2	1,00000	b
Scaf 3	1,00000	b
Scaf 4	1,00000	b

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Com relação a atividade celulolítica, a análise de variância foi significativa a 5% de probabilidade e CV=3.13, de acordo com a Tabela 4 e Anexo B. A maior degradação da carboximetilcelulase (CMC) foi observada para o isolado Scaf 2 (não identificado), seguido do Scac 2 (*C. sphaerospermum*) e Icaf 3 (*H. burtonii*), com médias de 1,57 cm, 1,43 cm e 1,37 cm, respectivamente. Os isolados que apresentaram baixas atividades enzimáticas na formação do halo de degradação do substrato CMC foram o Scac 1, Icaf 2, Icac 1, Scaf 3 e Icaf 1, com médias de 1 cm. Contudo, constatou-se que colônias com pouco crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos.

Estudos realizados por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), identificaram que a zona mais clara ao redor das colônias corresponde ao halo indicador da degradação da CMC, sendo esse halo observado em 36 linhagens, ou seja, 45% dos fungos pesquisados. Procurando-se comparar essas linhagens, foi estabelecido um índice enzimático e por meio deste observou-se os mesmos resultados para os seguintes isolados: *Penicillium herquei*, *Trichoderma hamatum*, *Penicillium miczynskii*, *Penicillium verruculosum* e *Penicillium glabrum*. Resultado semelhante foi observado em 48 linhagens de fungos isolados de aveia industrializada, que tiveram colônias de menor diâmetro e maiores valores de atividade de celulase (NOGUEIRA; CAVALCANTE, 1996).

Tabela 4. Médias de índice de atividade celulolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias	Tukey*
Scaf 2	1,5717	a
Scac 2	1,4333	b
Icaf 3	1,3689	cb
Icac 2	1,2787	cd
Icaf 5	1,2639	cd
Scaf 4	1,2209	ed
Scaf 1	1,1699	ed
Icaf 4	1,1245	e
Scac 1	1,0000	f
Icaf 2	1,0000	f
Icac 1	1,0000	f
Scaf 3	1,0000	f
Icaf 1	1,0000	f

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido citadas como boas produtoras de celulasas (KURASAWA et al., 1992; CASTILHO et al., 1994; KIM et al., 1997), e o gênero *Penicillium* tem sido constantemente utilizado como fonte de enzimas em vários setores industriais (CARVALHO et al., 1992; TEIXEIRA, 1994).

A maioria dos fungos considerados degradadores de celulose tendem a crescer e se desenvolver nas camadas superficiais do solo, onde ocorre maior acúmulo de nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Estudos realizados por Paul e Clark (1989) com microrganismos, constataram que os principais responsáveis pela decomposição da celulose no solo, através da ação enzimática, são os isolados dos gêneros *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Phoma*.

A análise de variância para a atividade lipolítica apresentou significância de 5% e com CV=2,21, conforme Anexo C. O teste de Tukey (Tabela 5) formou 4 grupos, onde os isolados que apresentaram as melhores atividades enzimáticas foram o Scac 1, grupo a, (*Rhinochadiella* sp.), o Scac 2, grupo b, (*Cladosporium sphaerospermum*), ambos isolados coletados de solo em plantação de cacaueteiro. O isolados que formam o grupo “c” apresentaram médias que variaram de 1,25 cm (Scaf 2) a 1,14 cm (Scac 2). Os isolados Icaf 2 (*Hyphopichia burtonii*), Icaf 1 (*Penicillium citrinum*), Icac 1 (*Verticillium* sp.), Scaf 3 (*Pseudallescheria boydii*), Scaf 1 (*Verticillium* sp) e Scaf 4 apresentaram baixas atividades enzimáticas para a lipase.



Alguns fungos produtores de lipases comercialmente importantes pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Candida* e *Penicillium* (TAN et al., 2003; ELLAIAH et al., 2004; LARIOS et al., 2004). A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características enzimáticas têm estimulado a procura de novos isolados de microrganismos lipolíticos (VARGAS et al., 2004). No caso de fungos filamentosos, a produção de lipase varia de acordo com o isolado, com o meio de cultura e com as condições de cultivo (SHARMA et al., 2001; CIHANGIR; SARIKAYA, 2004).

Tabela 5. Médias de índice de atividade lipolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias	Tukey*
Scac 1	1,5457	a
Scac 2	1,3968	b
Scaf 2	1,2461	c
Icaf 3	1,2344	c
Icaf 4	1,1765	cd
Icaf 5	1,1725	cd
Icac 2	1,1458	d
Icaf 2	1,0000	e
Icaf 1	1,0000	e
Scaf 1	1,0000	e
Icac 1	1,0000	e
Scaf 3	1,0000	e
Scaf 4	1,0000	e

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Para a atividade pectinolítica, a análise estatística foi significativa a 5% para o crescimento dos isolado no substrato pectina pH 5,0 e CV=3,22, de acordo com a Tabela 6 e Anexo D. O teste de Tukey formou 3 grupos a partir das médias de degradação dos substratos (Tabela 6), sendo o isolado Scac 2 (*C. sphaerospermum*) o que se destacou na degradação da desse substrato, com média de 1,55 cm de halo, seguido pelo Icaf 3 (*H. burtonii*), Scac 1 e Scaf 1, do segundo grupo, com médias de 1,38 cm, 1,36 cm e 1,31 cm, respectivamente. Os isolados Icaf 1 (*P. citrinum*), Icaf 2 (*H. burtonii*), Scaf 3 e Scaf 4 foram os que apresentaram menores atividades enzimáticas para pectina pH 5,0.

A enzima pectinolítica ultra secretada por *P. citrinum* tem sido explorada comercialmente no Japão para a obtenção de sabor, os quais são obtidos em milhares de toneladas/ano e comercializados em países asiáticos, europeus e recentemente na América,

adicionados a condimentos e alimentos pré-preparados (FUJIMOTO et al., 1974; SAMEJIMA et al., 1980; ZHU et al., 1996, citado por TAVARES et al., 1998).

Tabela 6. Médias de atividade pectinolítica - pectina pH 5,0 apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias	Tukey*
Scac 2	1,5467	a
Icaf 3	1,3806	b
Scac 1	1,3574	bc
Scaf 1	1,3071	bcd
Scaf 2	1,2581	cde
Icaf 4	1,2503	cde
Icac 2	1,1972	de
Icac 1	1,1926	de
Icaf 5	1,1840	e
Icaf 2	1,0000	f
Icaf 1	1,0000	f
Scaf 3	1,0000	f
Scaf 4	1,0000	f

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Deve ser considerada, no entanto, a necessidade do monitoramento da produção da toxina citrinina durante o crescimento do fungo. Vários trabalhos tem indicado a presença dessa toxina em determinadas condições de cultivo, por outro lado, tem sido demonstrado ser possível a inibição da síntese da mesma variando-se a composição de meio de cultura (GIRIDHAR; REDDY, 1997; PIMENTEL et al., 1996, citado por TAVARES et al., 1998).

A degradação da pectina pH 8,0 pela atividade enzimática dos isolados de fungos apresentou diferença significativa com um CV=4,91 entre as médias, como pode se observar no Anexo E. Na Tabela 7 observa-se que o teste de Tukey a 5% de probabilidade formou quatro grupos bem definidos a partir das médias dos halos de degradação da pectina em pH 8,0.

O isolado Scaf 2 e Icaf 3 (*H. burtonii*), do grupo a, e Scac 2, do grupo b, com médias de diâmetro de halos de 2,09 cm, 1,94 cm e 1,54 cm, respectivamente, foram os mais eficientes. Os isolados que apresentaram menor degradação desse substrato foram o Scac 1, Icaf 2, Icaf 1, Scaf 3 e Scaf 4.

De acordo com Sorensen et al. (2004), normalmente as leveduras não produzem ou não secretam pectina metil esterase, entretanto, suas pectinases podem ser usadas na clarificação de sucos e vinhos, indicando que genes codificadores de pectinases têm sido

clonados com sucesso e introduzidos em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* codificadoras de enzimas biologicamente ativas.

Tabela 7. Médias de atividade pectinolítica - pectina pH 8,0 apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solo em Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias	Tukey*
Scaf 2	2,0983	a
Icaf 3	1,9456	a
Scac 2	1,5425	b
Scaf 1	1,3209	c
Icaf 4	1,3184	c
Icac 2	1,2926	c
Icaf 5	1,1916	c
Icac 1	1,1549	cd
Scac 1	1,0000	d
Icaf 2	1,0000	d
Icaf 1	1,0000	d
Scaf 3	1,0000	d
Scaf 4	1,0000	d

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

A análise de variância da produção de quitinase pelos isolados de fungos estudados foi significativa a 5% e apresentou o maior CV (47,30) em relação aos outros substratos enzimáticos testados, como pode ser visualizado na Tabela 8 e Anexo F. O teste de Tukey agrupou as médias em dois grupos, sendo bem distinto apenas o primeiro com o isolado Scaf 1, com média de 1,57 cm de degradação da quitina, e os outros 12 isolados em outro grupo mesmo com médias variando de 0,86 cm (Scaf 2) a 0,03 cm (Scaf 3), conforme a Tabela 8. Fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *A. flavus* demonstraram a produção de múltiplas isoformas de quitinases (St. LEGER et al., 1993), dependendo do tipo de substrato presente no meio de cultura ou no ensaio enzimático. No entanto, a produção de quitinases por fungos entomopatogênicos são ativas em pH 5,0 e em pH alcalino (PEDRAZA-REYES; LOPEZ-ROMERO, 1989; PINTO et al., 1997; NAHAR et al., 2004 citado por SASSÁ, 2008).

Na Figura 9 pode-se visualizar a atividade enzimática de todos os isolados em função de cada substrato testado, em termos de degradações medidas pelos halos formados. Em uma avaliação conjunta do potencial dos isolados, em termos de atividade enzimática, observa-se que ao se estabelecer tamanhos de halos acima de 1,0 cm de diâmetro, somente os isolados Icaf 4 e Icac 2 foram eficientes para a amilase, seguidos pela CMC, lipase, pectina pH 5,0 e

pH 8,0. O Icaf 5, Icaf 3, Scac 2 e Scaf 2 foram eficientes para CMC, lipase, pectina pH 5,0 e pH 8,0.

Tabela 8. Médias de atividade quitinolítica apresentada pelos isolados de fungos obtidos de insetos e solos em Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias	Tukey*
Scaf 1	1,5733	a
Scaf 2	0,8556	b
Scaf 4	0,8111	b
Scaf 3	0,6600	bc
Scac 2	0,5044	bc
Icac 2	0,4911	bc
Icaf 4	0,4578	bc
Icaf 5	0,3933	bc
Icaf 1	0,3622	bc
Scac 1	0,2111	bc
Icac 1	0,0689	c
Icaf 2	0,0267	c
Icaf 3	0,0267	c

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

O Scaf 1 apesar de ter apresentado degradação dos substratos amilase e lipase iguais ou inferiores a 1,0 cm, foi o único a degradar a quitinase com halo acima deste valor, além do CMC, pectina pH 5,0 e pH 8,0. O Scaf 3 e Scaf 4 só apresentaram degradação neste nível para o CMC. O Scac 1 foi eficiente para lipase e pectina pH 5,0 e o Icac 1, para pectina pH 5,0 e pH 8,0. Os isolados Icaf 1 e Icaf 2 não apresentaram degradação enzimática maiores que 1,0 cm de diâmetro para os substratos testados.

Os substratos que foram degradados por maior número de isolados, considerando halos maiores de 1,0 cm de diâmetro, são CMC e pectina pH 5,0 com 9 isolados, pectina pH 5,0 com 8 isolados, lipase com 7 isolados, amilase com 2 isolados e quitinase, com 1 isolado.

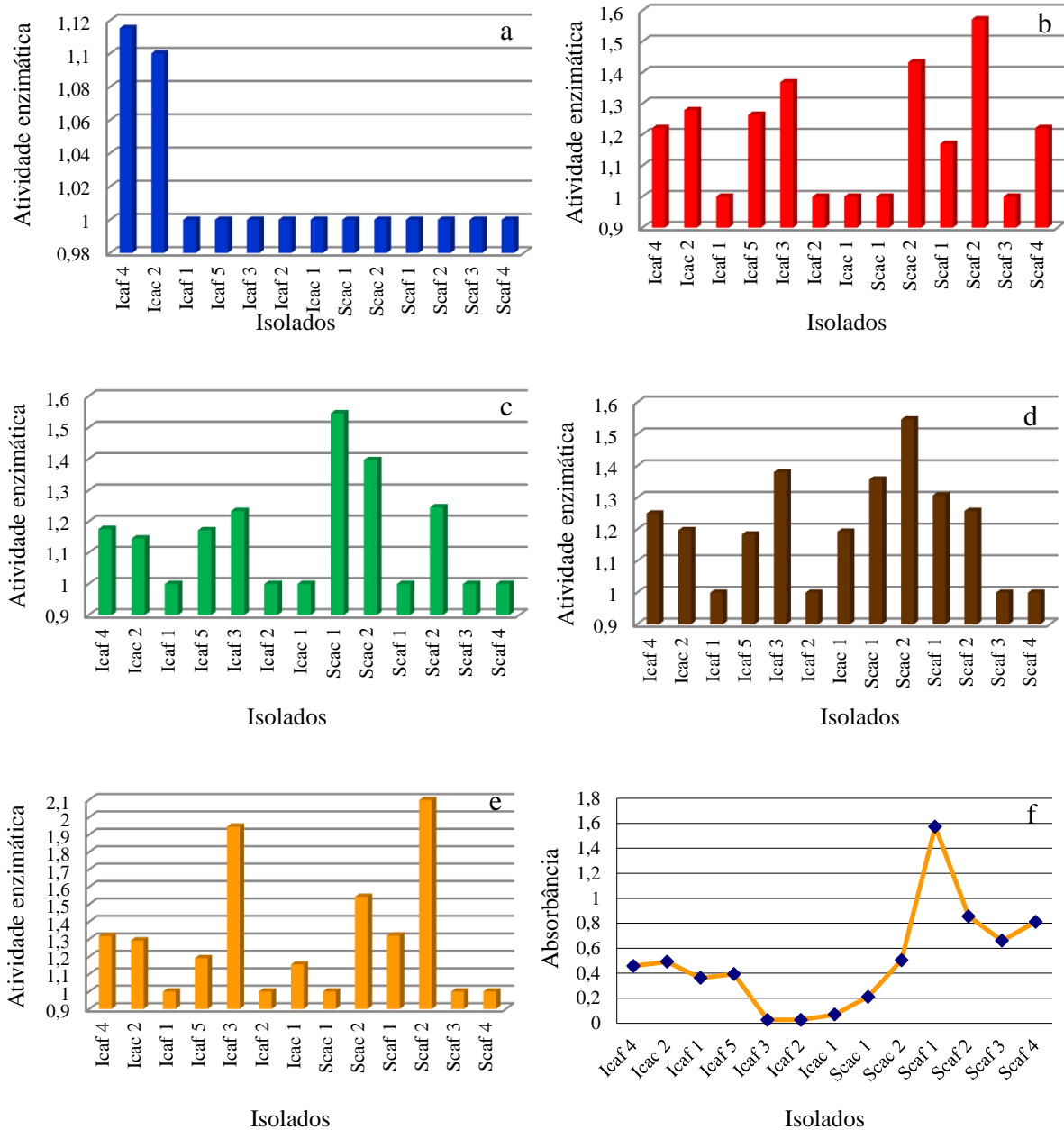


Figura 9. Atividades enzimáticas dos isolados de fungos obtidos de insetos e solo em diferentes substratos: a) amilase, b) CMC, c) lipase, d) pectina pH 5,0, e) pectina pH 8,0 e, f) quitinase. Altamira, Pará, 2012.

#### 4.6. Bioensaio contra o *M. annulipes*

O bioensaio realizado com os fungos Icac 1, Icac 2 e Icac 3 isolados de insetos de cacauero contra o monalônio, foi estatisticamente significativo a 5% de probabilidade, com um coeficiente de variação de 19,03, de acordo com a Tabela 9 e Anexo H. O teste de Tukey formou dois grupos a partir das médias da mortalidade dos insetos pelos isolados, sendo que o grupo “a” incluiu apenas o isolado Icac 3 por ser o único que causou mortalidade da praga e

no grupo “b” os outros isolados. A mortalidade dos insetos iniciou-se a partir do segundo dia ocorrendo uma estabilidade no oitavo dia, mas no décimo dia ainda ocorreu morte de insetos. O percentual de mortalidade do segundo ao quarto dia após a inoculação foi de 66%, alcançando 96% até o décimo dia de avaliação (Figura 10) para o isolado Icac 3.

Tabela 9. Índice de mortalidade do inseto *M. annulipes* pelos fungos isolados de insetos de cacauero. Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias/%	Tukey*
Icac 3	9,4	a
Icac 1	0.0	b
Icac 2	0.0	b
Controle	0.0	b

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

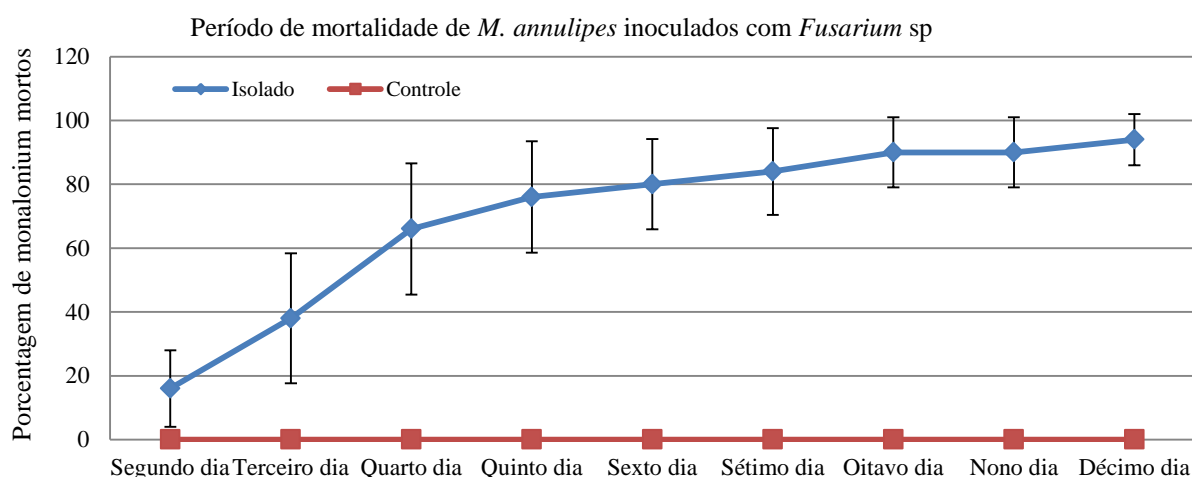


Figura 10. Porcentagem de mortalidade de *M.annulipes* por *Fusarium* sp. Altamira, Pará, 2012.

Em estudos de mortalidade de *Ronderosia bergi* por *F. verticillioides*, Pelizza et al. (2011) obtiveram índice de mortalidade de  $58 \pm 6,53\%$  em 10 dias após a inoculação. Majumbar et al. (2008) obtiveram maiores taxas de mortalidade em testes de laboratório, atingindo 80% de mortalidade com as pupas de *Tetanops myopaeformis* em 10 dias após aplicação, na concentração de  $2,8 \times 10^6$  de conídios/mL de *F. solani*. Uma mortalidade ainda maior foi observada por Golpalakrishnan e Narayan (1989), que relataram 100% de mortalidade após o tratamento com  $4,8 \times 10$  con./mL de *F. oxysporum* em *Pulvinaria psidii* (Hemiptera: Coccidae) em 5 dias. Além disso, uma mortalidade de 100% foi obtida dentro de

três dias em um teste de campo de *F. oxysporum* contra *Nilaparvata lugens* (Kuruvillea; Jacob, 1980).

Dessa forma, considera-se que o resultado obtido no bioensaio com o *Fusarium* sp. contra o *M. annulipes*, importante praga do cacaueteiro nos municípios de coleta, que foi satisfatória sendo esse isolado um agente promissor para o controle dessa praga nas lavouras cacaueteiras, em geral. Torna-se necessário, no entanto, avaliar o índice de mortalidade da praga nas condições de campo, para melhor confirmar o potencial do isolado.

Vários pesquisadores tem encontrado nos diversos países fungos entomopatogênicos do gênero *Fusarium* sp. Constata-se então, em diversos artigos, a eficácia em condições de campo do fungo *Fusarium semitectum* contra *Ceratovacuna lanígera*, na Índia; primeiro registro de *Fusarium verticillioides* como um fungo entomopatogênico contra gafanhotos na Argentina (PELIZZA, et al., 2011); descoberta de *Fusarium solani* como agente patogênico ocorrendo naturalmente em larva (Diptera: Ulidiidae) e pupas da praga da raiz de beterraba, em Dakota do Norte e Minnesota-USA.

Pesquisadores do Sri Lanka realizaram estudos sobre a patogenicidade do *F. semitectum* contra diversas pragas e sua biossegurança para organismos não-alvo e observaram que o entomopatógeno causou mortalidade em pragas sugadoras, tais como tripes, ácaros, pulgões e mosca-branca. No entanto, não causou mortalidade em larvas de insetos lepidópteros, besouros joaninha, ácaro predador e parasitóide larval, *Apis indica*, e também não teve influência na compostagem e crescimento de *Eisenia foetida*. Com esses dados concluiu-se que o *F. semitectum* é um isolado seletivo contra pragas sugadoras, seguro para apicultura, sericicultura, vermicultura nas indústrias de Karnataka, na Índia (MIKUNTHAN; MANJUNATA, 2006).

Estudos de Arantes e Correia (1999), identificaram a diversidade de fungos associados a *Parlatoria ziziphus* em citros, e a espécie de maior ocorrência e a mais prevalente nas coletas realizadas no interior de São Paulo foi a *Fusarium coccophilum*. Também no interior de São Paulo observou-se gêneros de fungos entomopatogênicos no controle microbiano da cochonilha ortézia em todos os seus estádios de desenvolvimento. Nesses gêneros incluem o *V. lecanii*, *C. gloeosporioides* e o *Fusarium* sp. (BENVENGA et al., 2004). Mais recentemente em pomares cítricos do Estado do Pará, pesquisadores verificaram a presença de fungos entomopatogênicos, dentre eles o *Fusarium* sp. sobre ninfas de mosca-negra-dos citros (SILVA et al., 2011).

#### 4.7. Bioensaio contra a broca-do-café

O bioensaio realizado com os fungos isolados de insetos Icaf 3, Icaf 2, Icaf 4, Icac 2, Icaf 1 e Icac 1 contra a broca-do-café, foi estatisticamente significativo a 5% de probabilidade, com um coeficiente de variação de 22,14 de acordo com a Tabela 10 e Anexo G. Três grupos foram formados a partir dos índices de mortalidade dos insetos colonizados pelos isolados. O grupo “a” inclui os isolados que foram mais eficientes contra a broca-do-café, sendo que o Icaf 3 e o Icaf 2 proporcionaram as maiores mortalidade ao final das avaliações, atingindo 96% e 94%, respectivamente. No grupo “b” o isolado Icaf 5 c apresentaram taxa de 62% de mortalidade e o grupo “c”, os isolados Icaf 4, Icac 2, Icaf 1 e Icac 1 com mortalidade de 34%, 28%, 28% e 26%, respectivamente, durante os 10 dias de avaliação do ensaio (Figura 11).

Tabela 10. Índice de mortalidade do inseto broca-do-café pelos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Isolados	Médias/%	Tukey*
Icaf 3	96	a
Icaf 2	94	a
Icaf 5	62	b
Icaf 4	34	c
Icac 2	28	c
Icaf 1	28	c
Icac 1	26	c

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Em verificações do efeito do modo de exposição de *Leptinotorsa decemlineata* (Say) ao fungo *B. bassiana*, Fernandez et al. (2001) observaram que as larvas pulverizadas com uma suspensão de conídios, apresentaram taxa de mortalidade de 76%. Santoro et al. (2007), confirmaram em estudos feitos comparando métodos de inoculação, que o método de pulverização comparado com o método de superfície sempre foi melhor utilizando as mesmas concentrações de conídios. Em pulverização, um maior número de conídios entra em contato com o corpo inteiro do inseto, com possibilidade de germinação e penetração, o que aumenta a mortalidade.



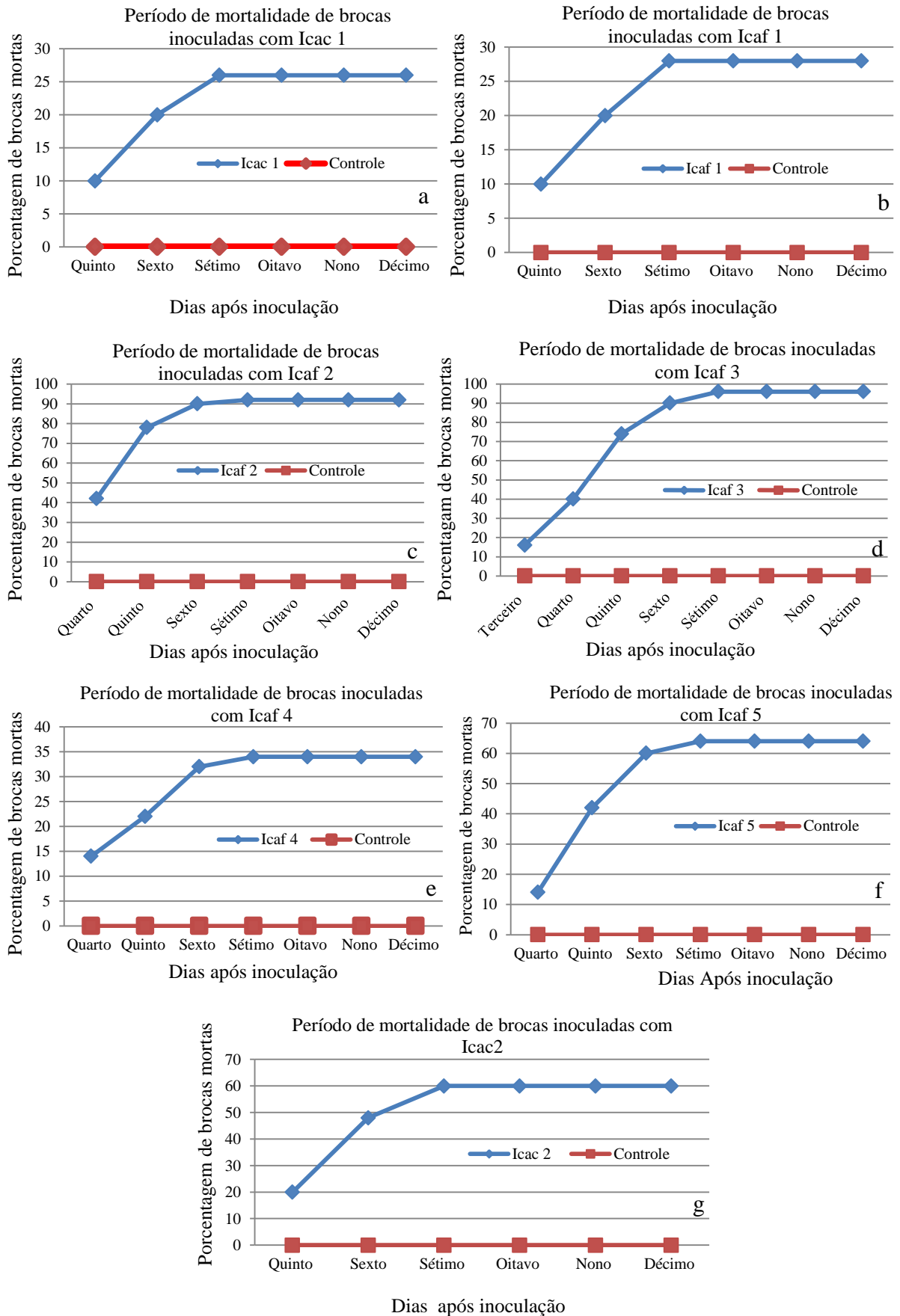


Figura 11. Percentagem de mortalidade de brocas-do-café por isolados de fungos: a) Icac 1, b) Icaf 1, c) Icaf 2, d) Icaf 3, e) Icaf 4, f) Icaf 5, g) Icac 2. Altamira, Pará, 2012.

Durante o bioensaio, após a inoculação, observou-se alguns sintomas nos insetos como a diminuição dos movimentos, depois eles ficaram com a face ventral para cima e as pernas afastadas do corpo e após a morte ficou rígido, detalhes estes também observados por IEDE (2010), além de observar que o inseto quando entra em contato com o isolado a penetração deste ocorre principalmente nos pontos frágeis, ou seja, nas regiões intersegmentais do corpo e tarsos, o mesmo visualizou Santoro (2007) no bioensaio com o isolado *B. bassiana* contra os adultos de *A. diaperinus*. Esses resultados estão de acordo com BUSTILLO et al. (1999) que verificaram em relação a dinâmica de fungos na cultura do café, que *B. bassiana* começa a atuar em adultos de *H. hampei* após cinco dias de aplicação.

Analisando-se a distribuição de mortalidade de adultos de *A. diaperinus* pelo isolado de *B. bassiana*, foi possível verificar que os insetos começaram a morrer a partir do segundo e terceiro dias após o contato com o inóculo. Os picos de mortalidade ocorreram entre o quarto, quinto e sexto dias, com tendência a se estabilizar a partir do sétimo e oitavo dias (SANTORO, 2007).

A distribuição da mortalidade no decorrer do tempo pode variar conforme a espécie estudada, como no trabalho de Andalo et al. (2004), que observaram que para cochonilha *Dysmicoccus texensis* (Tinsley), o início da mortalidade por *B. bassiana* ocorreu no sexto dia e estabilizou-se no décimo. Para *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus), a mortalidade por *B. bassiana* ocorreu a partir do segundo dia e parou ao sétimo dia após a inoculação (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005).

Em avaliações da suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* à fungos entomopatogênicos, Loureiro (2004) observou picos de mortalidade a partir do 4º dia da inoculação. Favaro (2006) em seu estudo com *Beauveria* sp. sobre psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* identificou picos de mortalidade a partir do 2º dia, enquanto que Puterka et al., (1994) relataram o tempo médio de mortalidade por volta do 3º dia. Tanzini (2002), Lopes (1999) e Neves (1998) também constataram que os maiores índices de mortalidade com *B. bassiana* ocorrem após o 3º dia de inoculação dos isolados testados.

O tempo letal para matar 50% (TL<sub>50</sub>) da população de insetos, com inoculação na concentração de  $1 \times 10^8$ , foi de 4 dias para o isolado Icaf 2, 5 dias para o isolado Icaf 3 e 6 dias para o isolado Icaf 5, com 28, 29 e 29 insetos mortos, respectivamente, de um total de 50 (Figura 10). O tempo letal para o trabalho de GASSEN (2006), para a mesma concentração foi de 2,94 dias. Loureiro (2001) avaliou a patogenicidade de fungos entomopatogênicos aos Hemípteros *Aphis gossypii* e *Myzus persicae*. O autor verificou para *A. gossypii*, que a concentração de  $1,0 \times 10^8$  con./mL de *B. bassiana* foi mais eficiente, com tempo letal de 2,39

dias e para *M. persicae* o fungo *M. anisopliae* mostrou-se mais virulento na concentração de  $1 \times 10^8$  con./mL, com  $TL_{50}$  de 1,76 dias. Estudos mostraram que existe diferença na virulência entre conídios produzidos em diferentes meios, por isso, é importante utilizar nos testes de seleção, o mesmo meio de cultura que será utilizado para produzir o fungo em larga escala para sua aplicação em campo.

As espécies de fungos testadas mostraram-se patogênicas, no entanto, o patógeno mais eficiente contra a broca-do-café foi o isolado *Hyphopichia burtonii*, pois apresentou mortalidade confirmada muito maior que as dos outros fungos testados. Para a concentração  $1 \times 10^8$ , a mortalidade obtida foi de 95%. O mesmo ocorreu com GASSEN, 2006 quando testou o fungo *B. bassiana* contra psilídeo da goiabeira *Triozoida* sp., o qual ocorreu maior mortalidade atingindo 67%. Testando diversas concentrações, os autores observaram que a concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL foi mais eficiente e provocou efeito letal mais rapidamente quando testada com *V. lecanii* contra ninfas de *C. atlântica*, causando mortalidade de 86% (LOUREIRO et al., 2004).

Segundo Chandrashekhar et al., (1990) foram feitas avaliações do efeito de micotoxinas no comportamento e sobrevivência de baratas. A toxina citrinina produzida pelo fungo *Penicillium citrinum*, quando injetada na hemocele, causa distúrbios nervosos que afetam a postura, locomoção e agilidade e leva a morte dos insetos.

Os isolados estudados demonstraram potencial importante para serem introduzidos em programas de biocontrole, com perspectivas de resultados promissores para controle microbiano, reforçando a idéia de que novas espécies com potencial podem ser isoladas em regiões não exploradas ou estudadas;

## 5. CONCLUSÕES

- Os fungos isolados de solo se destacaram na degradação dos substratos CMC, lipase, pectina pH 5,0, pectina pH 8,0 e quitina. Os melhores isolados para degradação foram Scaf 2, Scac 1, Scac 2, Scaf 2 e Scaf 1 respectivamente;
- Os isolados Icaf 2 e Icaf 3, ambos *H. burtonii*, e Icaf 5 são agentes promissores para o controle microbiano da broca-do-café *H. hampei*;
- O isolado Icac 3 (*Fusarium* sp.) é um agente promissor para o controle do *M. annulipes*.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D.; (eds.). **Molecular biology of the cell**. 3 ed. New York, Garland Publishing, 1994, 1294p.

ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da (Ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v.1: Produção e produtividade agrícola, 2008, 1337p.

ALEXANDRE, T.M.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H.; ALVES, L.F.A. Controle associado de *Alphitobius diaperinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e inseticidas químicos. **Arquivos Instituto Biológico**. 75, 481-489, 2008.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1996, 865p.

ALFENAS, A.; JENG, R.S.; HUBBES, M. Variation in pathogenicity and isoenzyme patterns among isolates of *Cryphonectria cubensis*. Abstracts, **48<sup>th</sup> Annual meeting of the Canadian Phytopathological Society**. Edmonton, Canada. 1982, 303p.

ALFENAS, A.C. **Virulence and isoenzyme patterns of *Cryphonectria cubensis*, causal agent of the eucalyptus canker. (PhD Thesis)**. Toronto. University of Toronto. 1983.

ALFENAS, A.C.; JENG, R.S.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Canadian Journal Botany** 62:1756-1762, 1984.

ALKORTA, J.; GARBISU, C.; LEAMA, M.; SERRA, M.J. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; LAMAS, C.; LEITE, L.G.; TRAMA, M.; SANO, A. H. Avaliação da compatibilidade de defensivos agrícolas na conservação de microrganismos entomopatogênicos no manejo de pragas do cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n.1, p. 79-84, 2003.

ALVES, S.B. Agentes entomopatogênicos no controle microbiano Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, p. 73-126. Cap II. 1986b.

ALVES, S.B. Chaves para identificação de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B., FERRAZ, L.C.C.B.; CASTELO BRANCO JR. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.1039-1073, 1998.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163p.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.289-370, 1998.

ALVES, S.B. Patologia Geral. In: ALVES, S.B. ed. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986a. p.407.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap. 5, p.97-169, 1998.

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

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.765-777, 1998.

ANAND, R.; PRASAD, B.; TIWARY, B.N. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. **Biocontrol**. 54, p. 85-92, 2009.

ANDALÓ, V.; MOINHO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 181-187, 2004.

ANDERSEN, S.O. Biochemistry of insect cuticle. **Annual Review Entomology**. 24: p.29-61, 1979.

ANDERSON, R.F.; IGNOFFO, C.M. **Microbial insecticides**. PEPPLER. H.J. (Ed.), Microbial Technology, Reinhold, New York, p. 172-182, 1967.

ANDRADE, V.S. Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.2, p.106-110, 2002.

ARANTES, A. M. V. T.; CORREIA, A. C. B. Diversidade de Fungos Associados a *Parlatoria ziziphus* (Lucas)(Hemiptera: Diaspididae) em Citros. **Anais Sociedade Entomologia Brasil**, 28 (3), p. 477-483, 1999.

AZEVEDO, A.M. V. **Diversidade de fungos em dois sítios de terra preta de índio e solos adjacentes na região de confluência dos rios Negro e Solimões**. 2006, 90p, Dissertação (Mestre em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia). Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-AM, 2006.

AZEVEDO, J. L. Controle Microbiano de Insetos-Pragas e seu Melhoramento Genético. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP, EMBRAPA, v. 1, p. 69-96,1998.

AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente. 1998.

AZEVEDO, J.L. Engenharia Genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP, Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

AZEVEDO, J.L. Genética de Fungos. In: Esposito E.; Azevedo J.L. (Org.). **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, v.01, p. 173-211, 2004.

BARRETO, R.S.; MARQUES, E.J.; GONDIM Jr M.G.C.; OLIVEIRA, J.V. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. For the control of the mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar). **Sci Agric.** 61, p. 659-664, 2004.

BARROS, N.M.; VARGAS, L.R.B.; SCHRANK, A.; BOLDO, J.T.; SPECHT, A. Fungos como agentes de controle de pragas. In: Esposito E.; Azevedo J. L.; (Org.). **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 02 ed. Caxias do Sul: EDUCS, v.01, p. 491-531, 2010.

BASSO, T.P.; GALLO, C.R.; BASSO, L.C.; Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa agropecuária brasileira,** Brasília, v.45, n.11, p. 1282-1289, Nov.2010.

BASTOS, E. Cacau. A riqueza agrícola da América. Ícone Editora Ltda, São Paulo, 1987, 103p

BATISTA FILHO, A.; ALVES, L.F.A.; MUNIS, J.P. Determinação da eficiência de três concentrações de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., no controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1967) (Coleoptera: Scolytidae). **Revista de Agricultura,** v.67, p.167-170, 1992.

BAYER, E.A.; LAMED, R. The cellulose paradox: Pollutant *par excellence* and/or a reclaimable natural resource. **Biodegradation,** 3, p. 171-188, 1992.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology,** v. 44, p. 219-248, 1990.

BENVENGA, S. R.; GRAVENA S.; SILVA, J. L.; ARAÚJO JÚNIOR, N.; AMORIM, L. C. S. Manejo prático da cochonilha ortézia em pomares de citros. **Laranja,** Cordeirópolis, v. 25, n. 2, p. 291-312, 2004.

BERNAL, M.G.; BUSTILLO, A.E.; CHAVES, B.; BENAVIDES, P. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre poblaciones de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) que emergen de frutos em El suelo. **Rev. Colomb. Entomol.,** v.25, p.11-16, 1999.



BERNIER, L.; JENG, R.S.; RUBBES, M. Differentiation of aggressive and nonaggressive isolates of *Ceratocystis ulmi* by gel electrophoresis of intramycelial enzymes. **Mycotaxon** 17, p. 456-472, 1983.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. **Biotechnology Advances**, 18, p. 355-383, 2000.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. **Process Biochem.** 37, 2001, 497p.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1795-1805, 1988.

BRAGA, G.U.L.; DESTÉFANO, R.H.R.; MESSIAS, C.L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n.2, p.107-113, 1999.

BRIDGE, P., SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**. v. 232, p.147-154, 2001.

BRUN, L.O., MARCILLAUD, C., GAUDICHOU, V., SCUKLING, D. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal Econ. Entomology**. 82, p. 1311-1316. 1989.

BURDON, J.J.; ROELFS, A.P. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. **Phytopathology**. 75, p. 907-913, 1985.

BURGES, A.; RAW, F. **Biología del suelo**. Ediciones, OMEGA, S. A. Barcelona, 1971, 596p.

BUSTILLO, A.E.; BERNAL, M.G.; BENAVIDES, P.; CHAVES, B. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. **Fla. Entomology**, vol.82, p.491-498, 1999.

BUTT, T.M.; GOETTEL, M.S. Bioassays of entomogenous fungi. In Navon, A.; Ascher, K.R.S. (eds.), **BioAssays of entomopathogenic microbes and nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 3368. 2000.

CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. **Advances Enzym**, 59, p. 59-101, 1987.

CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.V.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J. L.; SCHARANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology**. 50, p. 257-261, 2005.

CASTELANI, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **Journal Tropical Med. Hyg**, 42: 225. 1939.

CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresour Technol**, v. 71, n.1, p 45-50, 2000.

CASTILLO, M. R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; LINDEN, J. C.; TENDERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnology Letters** 16, 967-972.

CASTRILLO, L.A.; ROBERTS, D.W.; VANDENBERG, J.D. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**. V. 89, p. 46-56, 2005.

CHANDRASHEKHAR, S.; SURYANARAYANAN, T.S.; MURTHY, V.A. Effects of citrinin, a mycotoxin, on behavior of cockroach. **Current Science**, v. 59, n. 2, p. 108-109, 1990.

CHAPMAN, R.J. **Integument. In: The insects: structure and function.** 4<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, p. 415-440, 1998.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p. 270-277, 1998.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.** UFMG-Belo Horizonte. Tese de Doutorado. 2006.

COUTINHO, H.L.C. Diversidade Microbiana e Agricultura Sustentável. **Workshop Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**, Campinas, 1996, 17p.

DAL BELO; PADIN, G.S.; LÓPEZ LASTRA, C.; FABRIZIO, M. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the Rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grain. **Journal Stored. Prod. Res.** 37, p. 77-84, 2001.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova.** v. 27, n.4, São Paulo July/Aug, 2004.

DEISING, H.; NICHOLSON, R.L.; HANG, M.; HOWARD, R.J.; MENDGEN, K. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in attachment of uredospores to the host cuticle. **Plant Cell.**, 4, p.1101-1111, 1992.

DIAS, L.A.S. Origem e Dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacaueiro.** Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 3, p. 81-127.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi.** Federal Republic of Germany. IHV. Verlag, v. 1, 1993, 859p.

DONG, C.; ZHANG, J.; CHEN, W.; HUANG, H.; HU, Y. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analyses. **Microbiol Research.** 162, p. 53-61, 2007.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**. 104, p.134-150, 2000.

DUCRUET, J.; GLORIES, Y.; Use of enzymes for grapes and red wines. **Vignevini**. 29:5, p. 44-47, 2002.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Wallingford: CAB International, 1971, 608p.  
EMBRAPA. Cultivo do café robusta em Rondônia. **Sistema de Produção**, 5, 2005.

FALCON, L.A. Use of bacteria for microbial. IN. BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. Microbial control of insects and mites. **Academic Press**. New York. p. 67-95, 1971.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P.O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: Situação atual e perspectivas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 22, p. 18-21, 2001.

FARIA, M.R.; WRIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**. 43, p. 237-256, 2007.

FAVARO, R. M. **Aspectos bionômicos de *Glycaspis (Glycaspis) brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Psyllidae) e seu controle com fungos entomopatogênicos**. 2006. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FERNANDEZ, S.; GRODEN, E.; VANDENBERG, J.D.; FURLONG, M.J. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 217-226, 2001.

FERREIRA, J.F.; MARQUES, E.J.; MARQUES, I.M. R.; OLIVEIRA, J. V.; SANTOS, JÚNIOR, H. J. G. Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos de *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Magistra**. 17, p. 119-123, 2005.

FERREIRA, L.T. Clones tecnológicos, a salvação da lavoura do cacau. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 3, Nov./dez. 1997. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio03/3hp7.pdf>. Acesso em: fev. 2012.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília. Embrapa, 1998, 220p.

FERRON, P. Biological control of insects pest by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, 23, p. 409-442, 1978.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia – Diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.14, p.12-16, 2000. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/>. Acesso em dez.2011.

GARCIA, M.O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha: Ortheziidae)**. 2004. 57p. Dissertação (Mestre em Ciências)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo, 2004.

GASSEN, M.H. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o Psilídeo da goiabeira *Triozoida* sp. (Hemiptera: Psyllidae) e compatibilidade de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre estes agentes de controle biológico**. 2006. 110p. Dissertação (Mestre em Agronomia-Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, 2006.

GILLER, K.E., BEARE, M.H., LAVELLE, P., IZAC, A.M.N., SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 3-16, 1997.

GILLESPIE, A.T.; CLAYDON, N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. **Pesticide Science**, Oxford, v. 27, p. 203-215, 1989.

GONÇALVES, C. R. Procedimento da *Orthezia* na Baixada Fluminense e o seu combate racional. **Boletim de Campo**,

GOODAY, G.H.; ZHU, W.Y.; DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **Fems Microbiol Lett**, 100, p. 387-392, 1992.

GOPALAKRISHNAN, C. NARAYANAN, K. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* Schlecht e sua patogenicidade em inseto da goiabeira *Chloropulvinaria psidii* Maskell (Hemiptera: Coccidae). **Current Science**, 58, p. 92-93, 1989.

GUMP, B. H.; HALGHT, K. G. A preliminary study of industrial enzyme preparations for color extraction stability in red wines. **California Agricultural Technology Institute-Cati**. Publications, sept. 1995.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWANI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$  – Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. p. 1-18, jan. 2003.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 383-432, 1998.

HANLON, G. W.; KOOLOOBANDI, A.; HUTT, A. J. Microbial metabolism of 2-arypropionic acid effect of environmental on the metabolism of ibuprofen by *Verticillium lecanii*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p. 442-447, 1994.

IEDE, E.T.; PENTEADO, S.R.C.; LEITE, M.S.P. Bioinseticida controla a broca da erva mate. **Controle Biológico. A Lavoura**. Outubro, 2010.

IEDE, E.T.; PENTEADO, S.R.C.; REIS FILHO, W.; QUEIROZ, E.C. Ocorrência de *Cinara pinivora* (Homoptera: Aphididae, Lachnidae) em reflorestamento de *Pinus* spp. no sul do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 30, **Anais**. Recife, 1998, p.141.

IGNOFFO, C.M. Entomopathogens as insecticides. **Environmental Letters**, London, v. 8, p. 24-40, 1975.

JACCOUD, D.B. Formigas cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas. Brasília: IBAMA, 60p. (Série Meio Ambiente em debate, 34). 2000.

JACKSON, T.A.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: *Biological control: measures of success*. Gurr, G.; Wratten s. (Eds.) 271-296. **Academic Press**. London, 2000.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipase. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbial. Rev.**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, 2005.

JENG, R.S.; RUBBES, M. Identification of aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* by polyacrylamide gradient gel electrophoresis of intramycelial proteins. **Mycotaxon**, 17, p. 445-455, 1983.

KENNEDY, A.C., GEWIN, V.L. Soil Microbial Diversity: Present and Future Considerations. **Soil Science**, v. 162, n. 9, p. 607-617, 1997.

KHACHATOURIANS, G.G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: **The Mycota VI: Human and Animal Relationships**. Howard/Miller (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**. 59, p. 63-67, 1997.

KISHIMOTO, K.; TABEL, Y.; HIBI, T.; NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K.; Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to grey mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Sci** 162, p. 655-662, 2002.

KOBAYASHI, R.S.; SANTOS, A.O.S.; BASTOS, C.N.; SILVA, F.C.O.; SCERNE, R.M.C. Caracterização Morfológica de Frutos e Sementes de Clones de Cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) silvestres da Amazônia Brasileira. **Boletim Técnico**. 19, Belém, PA, Brasil, CEPLAC/SUPOR, 2001, 58p.

KUNOH, H.; YAMAOKA, N.; YOSHIOKA, H.; NICHOLSON, R.L. Contact tropism by *Erysiphe graminis*: release of esterase. **International Congress of Plant Pathology**, 5. Kyoto, Japão. 1988, 235p.

KURASAWA, T.; YACHI, M.; SUTO, M.; KAMAGATA, Y.; TAKAO, S.; TOMITA, F. Induction of cellulose by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 58, p. 106-110, 1992.

KURUVILLA, S.; JACOB, A. Estudos sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht infectando arroz, *Nilaparvata lugens* Stal, **Pesquisa Agrícola Jornal Kerala**, 18, p. 51-54, 1980.

LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W.; Safety of microbial insecticides. **Boca Raton**, Florida, CRC Press, 1990. 259p.

LANZA, M.L.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E. B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.6, p. 1757-1762, nov-dez, 2004.

LARIOS, A.; GARCIA, H.S.; OLIART, R.M.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida Antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65, p. 373-376, 2004.

LEADRAY, P.F. An Introduction to Enzyme Chemistry. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 1993. 82p.

LEE, K.T.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K.S.; Production of alkyl ester as biodiesel from fractioned lard and restaurant grease. **Journal Am. Oil Chem. Soc.**, v. 79, p. 191-195, 2002.



LI, G.; YUHUA, Y.; LIYING, W. Influence of temperature and nutrition on growth of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Beijing strain). **Chinese Journal of Biological Control**, v.7, p. 115-119, 1991.

LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R.; JINDAMORAKOT, S.; YONGMANITCHAI, W.; NAKASE, T. *Candida wangnamkhiaoensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Hyphopichia clade* isolated in Thailand. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 102, p. 23-28, 2012.

LINGG, A.J.; DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 38, n.2, p. 191-200, 1987.

LOPES, R. B. **Seleção de fungos entomopatogênicos e controle de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae)**. 1999. 72p. Dissertação (Mestrado na área de Entomologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

LORD, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 89, p.19-29, 2005.

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

LOUREIRO, E. de S.; OLIVEIRA, N.C.; WILCKEN, C.F.; BATISTA FILHO, A. Patogenicidade de *Verticillium lecanii* ao pulgão-do-pinus. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p.765-770, 2004.

LOUREIRO, E.S. **Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com outros produtos fitossanitários e sua interação com *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (Hemiptera: Aphididae) e *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae)**. 2001. 121p. Dissertação (Mestre em Agronomia - Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

LYND, L.R.; WEIMER, P.L.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, p.506-577, 2002.

MAJUMBAR, A.; BOETEL, M. A. JARONSKI, T. S. Descoberta de *Fusarium solani* como patógeno natural de beterraba raiz larva (Diptera: Ulidiidae) pupas: Prevalência e susceptibilidade inicial. **Journal of Invertebrate Pathology**, 97, p. 1-8, 2008.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 127p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARITA, J. M.; NIENHUIS, J.; PIRES, J. L.; AITKEN, W. M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches broom disease resistance. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1305-1316, 2001.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, A.M.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (ed.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agropecuária**. Caxias do Sul: EDUCS, p.101-130, 2002.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico III**. Embrapa, Meio Ambiente, Jaguariúna. V. 3, 2000, 388p.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Controle Microbiano de Insetos Pragas e seu Melhoramento Genético. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. v.1, cap.2, p.69-96, 1998.

MENDES, A.C.B. Manejo das Pragas. In: SILVA NETO, P.J. da et al. **Sistema de Produção de Cacau para a Amazônia Brasileira**. Belém, CEPLAC, p. 48-63, 2001.

MENEZES, C.R.; SILVA, I.S.; DURRANT, L.R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**. v.5, n.1, p.68-78, 2009.

MENEZES, J.A.S.; CARMO-NETO, D. **A modernização do agribusiness cacau**. Fundação Cargill, Campinas (2 ed.). 1993. 56p.

MICHELI, A. **Variabilidade intraespecífica, inimigos naturais e avaliação da mistura de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 2005. 115p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, 2005.

MICHEREFF FILHO, M.; FANCELLI, M.; NEVES, P.M.O.J.; TIGANO, M.S.; LOPES, R.B.; OLIVEIRA, S.O.D.; OLIVEIRA, M.W. Metodologias de inoculação de *Beauveria bassiana* para avaliação da virulência em adultos de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 24p. Embrapa-CNPMP. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 47, 2010.

MIKUNTHAN, G.; MANJUNATHA, M. Patogenicidade de *Fusarium semitectum* contra pragas e sua biossegurança para organismos não-alvo. **Commun Agric Applied Biol Sci**, 71, p. 465-73, 2006.

MONTEIRO, A.C. **Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus)**. São Carlos, 233p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 1988.

MOREIRA, F.M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. UFL Editora, 2002, p. 373, 384.

MOREIRA, G.F. Production of amylases by *Aspergillus tamari*. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 30, p. 157-162, 1999.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia**, 19, p.78-81, 1988.

NERY CONTI, S.A. **Aspectos fisiológicos e ecológicos do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorokin 1883 no controle biológico da cigarrinha das pastagens *Deois (Acanthodeois) flavopicta* (Stal, 1854).** 1986, 274 p. (Dissertação) Mestrado em Ecologia, UfSCar, São Carlos-SP, 1986.

NEVES, M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**. 34, p. 77-82, 2005.

NEVES, P. O. M. J. **Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com fungos entomopatogênicos e o inseticida imidacloprid.** 1998. 111p. Tese (Doutorado na área de Entomologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

NIELSEN, R.I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**. v. 12, n. 3, p.69-71, 1998.

NILSSON, U.; GRIPWALL, E. Influence of the technique on the viability of the biological control agents *Verticillium lecanii* and *Steinernema feltiae*. **Crop Protection**, Guilford, v. 18, p. 53-59, 1999.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, 27, p. 7-9, 1996.

OLIVEIRA, C.N.; NEVES, P.M.O.J.; KAWAZOE, L.S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. **Sci. Agr.**, 60, p. 663-667. 2003.

OLIVEIRA, S.M.C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos.** Jaboticabal, 45p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), 2000.

ONDIKA, S.; MANIANIA, A.N.K.; NYAMASYO, G.H.N.; NDERITO, J.H. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. **Annual Applied Biological**, 153 p. 41-48, 2008.

ORBERG, P.K. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Dissertação de Mestrado, Oregon State University, Oregon. 1981.

PANDEY, A.; NIGAN, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amilases. **Biotechnology Applied Biochemical**. v.31, p.135-152, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1<sup>a</sup> ed. **New Delhi: Asiatech Publishers, Inc**, 2005, 760p.

PARENICOVA, L. pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, London, v. 345, p. 637-644, 2000.

PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 42, p. 37-51, 1993.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D.; **Biochemical Techniques for Filamentous Fungi**. **Wallingford. C.A.C. International**. 1994, 125p.

PATIL, R.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: na exploration. (Review). **Enzime Microbial Technology**. 26, p. 473-483, 2000.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiologi and biochemistry**. New York, 1989, 273p.

PELIZZA, S. A.; STENGLEIN, S. A.; CABELLO, M. N., DINOLFO, M. I. LANGE, C. E. Primeiro registro de *Fusarium verticillioides* como um fungo entomopatogênico de gafanhotos. **Journal Insect Sci**. 11: 70, 2011.

PENTEADO, S.R.C.; REIS FILHO, W.; IEDE, E.T.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; QUEIROZ, E.C. Ocorrência de *Verticillium lecanii* em populações de *Cinara pinivora* e *Cinara atlântica*, no Brasil. In: Simpósio de Controle Biológico, 7, **Anais**, Lavras, 2001, p.324.

PEREIRA, F.F.; BARROS, R.; PRATISSOLI, D.; PARRA, J.R. P. Biologia e Exigências Térmicas de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. exiguum* Pinto & Platner (hymenoptera: Trichogrammatidae) Criados em Ovos de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidóptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 231-236, 2004.

PEREIRA, R.T.G.; PFENNING, L.H.; CASTRO, H.A. Caracterização e Dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) **Ciências Agrtec**. Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez., 2005.

POTRICH, M. Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. para controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) **BioAssay**. 1:12, 2006.

PURDY, L.H.; SCHIMIDT, R.A. Status of cacao witches broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical Crops: dicotyledons**. Harlow: Longmans, 1968, 453p.

PUTERKA, G. J.; HUMBER, R. A.; POPRAWOSKI, T. J. Virulence of fungal pathogens (Imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear psylla (Homoptera: Psyllidae). **Environmental Entomology**. v. 22, n. 2, p. 514-520, 1994.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, 1, p. 17-20, 1985.

RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H.F.; GRUTZMACHER, A.D.; MARTINS, S.D.J.F.; TCACENCO, F.A.; MATOS, M.L.T. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. **Arquivos Instituto Biológico**. 74, p. 141-148, 2007.

RAPP, P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 17, p. 832-838, 1995.

RATH, A.C. Ecology of entomopathogenic fungi in field soils. In: International Colloquium on invertebrate pathology and microbial control, 8. Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Foz do Iguaçu: Society for Invertebrate Pathology, p. 65-71, 2002.

REIS, P.R.; SOUZA, J.C. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v.19, p.17-25, 1998.

RHODE, C.; ALVES, L.F.A.; BRESSAN, D.F.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; PINTO D.O.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Metarhizium anisolpliae* (Metsch) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, 35 p. 231-240, 2006.

RIBEIRO, J.Z. **Presença, influência e transmissão de RNA dupla fita no fungo *Metarhizium anisolpliae* (Metsch) Sorok**. Dissertação de Mestrado. Curitiba, UFPR.

RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J.A.K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M.H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 948-955, 2000.

RODRIGUES-GULMAN, M.P. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. **Acta Zoológica Mexicana**, número especial 2001. 1, 57-78.

ROVESTI, L. et al. Use of entomopathogenic fungi for pest control in protected crops in Italy. **Bulletin section Regionale Ouest Paelartique**. v.20, n. 4, p. 285-292, 1997.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUSTIGUEL, C.B.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Estudo comparativo da produção de quitinases pelos isolados 167 e 384 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: **Resumos do 12º Simpósio de Controle Biológico (SINCOBIOL)** “Mudanças climáticas e sustentabilidade: quebra de paradigmas. São Paulo. 2011.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and parasite interaction. **FEMS microbial Rev.** 11, p. 317-338, 1993.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin. pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SAMSINAKOVA, A. Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 8, p. 395-400, 1966.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and air borne fungi**. 6. ed. Baarn: CBS, 2000. 389p.

SAMUELS, R.I.; CORACINI, D.L.A.; SANTOS, C.A.M.; GAVA, C.A.T. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Llygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biological Control** 23, p. 269-273, 2002.

SANTORO, O.H.; NEVES, P.M.O. J.; ALEXANDRE, T.M.; SARTORI, D.; ALVES, L. F. A.; FUNGARO, M. H. P.; Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal Invertebrate Pathology**. 97, p.83-90, 2008.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 483-489, 2007.



SANTOS, A.V. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, Netherlands, v. 163, n. 4, p. 223-240, 2007.

SASSÁ, D.C.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T.; NEVES, P.M. de O.J.; WU, J.I.; SUGAHARA, V.H.; MITA, C.; KAMOGAWA, E.; Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidos por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 29, n. 4, p. 807-814, out/dez. 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERRIEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 627-662, 2001.

SILVA NETO, P.J. Classificação Botânica. In: SILVA NETO, P.J. da et al. **Sistema de Produção de Cacau para a Amazônia Brasileira**. Belém, CEPLAC, p.11-14, 2001.

SILVA, A. G. da; FARIAS, P. R. S.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S. Mosca-Negra-dos-Citros: Características Gerais, Bioecologia e Métodos de Controle dessa Importante Praga Quarentenária da Citricultura Brasileira. **EntomoBrasilis** 4 (3), p. 85-91, 2011.

SILVA, C.R.S.; FIGUEIRA, A.V.O.; SOUZA, C.A.S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 2, p. 49-80.

SILVA, M.E.; DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 17, n. 2, p. 263-269, 1988.

SOCCOL, C.R.; ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIE-CHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: **Asiatec Publishers Inc.**, p. 221-230, 2005.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham.** Vol. 34 (2), p. 185-195, 2004.

SOUZA, J.C. de; REIS, P.R. Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. 2. ed. Belo Horizonte: EPAMIG, 40p. (Boletim técnico, n. 50), 1997.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R. Controle da traça-do-tomateiro em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 343-354, 1986.

St. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.709-713, 1998.

STEENBERG, T.; HUMBER, R.A. Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p.309-314, 1999.

STUDDERT, J.P.; KAYA, H.K. Water potential, temperature and clay-coating of *Beauveria bassiana* conidia: Effect on *Spodoptera exigua* pupal mortality in two soil types. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 56, n.3, p. 327-336, 1990.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Hidrólise do Amido. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.** v. 3, cap. 15, p. 377-395, 2003.

SUWANNAKUT, S., BOUCIAS, D.G.; WIWAT, C. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, 90, p. 169-176, 2005.

SZAKACS, G. Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. In: **Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries**, Clermont-Ferrant, France. v. 1, 2004, 20p.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase production *Candida* sp and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry** 39, p. 459-465, 2003.

TANZINI, M. R. **Controle de percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos**. 2002. 140p. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. R.; SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: Depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, 21 (6), p. 722-725, 1998.

TREVISAN, O. Manejo do percevejo *Monalonion annulipes* em cacauzeiros de Rondônia. **CEPLAC**, Porto Velho, RO: Gráfica M& M, 2002.

TUBESHA, Z.A.; AL-DELAIFY, K.S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v.4, p.237-241, 2003.

TUNGA, R.; TUNGA, B.S. Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation. **International Center for Biotechnology**. Japan: Osaka University, 2003, 12p.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n.2, 388-394, 2007.

ULHOA, C.J.; PEDEERBY, J.R. Purification and some proprieties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial. Technology**, 14, p. 236-240, 1992.

VAN DER SCHAAF, D.A.; MALAIS, M.; RAVENSBERG, W.J. The use of *Verticillium lecanii* against whitefly and thrips in glasshouse vegetables in the Netherlands In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTABRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL COTROL, 5., Adelaide. **Proceedings...** Adelaide: Society of Invertebrate Pathology, 1990, p.391.

VEEN, K.H. Recherches sur La maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le croquet pelerine. **Meded. Landbouwhogesch.** Wageningen, 68, p.1-77, 1968.

VERHAAR, M. A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology.** v. 99, p. 101-103, 1993.

VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, UK, v. 65, n.4, p. 497-522, 2001.

YANG, Y.; CAI, S.; ZHENG, Y.; LU, X.; XU, X.; HAN, Y. *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* Nov., Anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. Nov. Isolated from a Low Altitude Area in Chongqing, China. **Current Microbiol.** doi: 10. 1007/ s00284-009-9382-2, 2009.

YURLOVA, N.A.; de HOOG G.S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **PubMed.** Aug: 72(2): 141-147, 1997.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R.; Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

**ANEXOS**

ANEXO A - Tabela 11. Análise de variância para o resultado da atividade amilolítica dos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamentos	12	0,05924	0,00494	189,26*	< 0,0001
Resíduo	26	0,00068	0,00003		
Total	38	0,05992			
	CV	0,50239			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO B - Tabela 12. Análise de variância para o resultado da atividade celulolítica dos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamentos	12	1,30877	0,10906	79,13*	< 0,0001
Resíduo	26	0,03583	0,00138		
Total	38	1,34459			
	CV	3,12739			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO C - Tabela 13. Análise de variância para o resultado da atividade lipolítica dos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamento	12	1,10999	0,09249	144,06*	< 0,0001
Resíduo	26	0,01669	0,00064		
Total	38	1,12669			
	CV	2,2082			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO D – Tabela 14. Análise de variância para o resultado da atividade pectinolítica pH 5,0 dos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamento	12	1,06478	0,08873	59,03*	< 0,0001
Resíduo	26	0,03908	0,00150		
Total	38	1,10386			
	CV	3,2156			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO E - Tabela 15. Análise de variância para o resultado da atividade pectinolítica pH 8,0 dos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamento	12	4,78929	0,39911	98,39*	< 0,0001
Resíduo	26	0,10547	0,00406		
Total	38	4,89475			
	CV	4,90944			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO F - Tabela 16. Análise de variância para o resultado da atividade quitinolítica dos isolados de fungos. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamento	12	6,45073	0,53756	9,78*	< 0,0001
Resíduo	26	1,42841	0,05494		
Total	38	7,87914			
	CV	47,2986			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO G - Tabela 17. Análise de variância para o resultado do bioensaio dos isolados contra a broca-do-café. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamento	7	41.840	5977.14	57.61*	<.0001
Resíduo	32	33.200	103.75		
Total	39	45.160			
	CV	22.140			

\*Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO H - Tabela 18. Análise de variância para o resultado do bioensaio dos isolados de fungo contra o Monalonium. Altamira, Pará, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	Pr > F
Tratamento	3	331.350	110,450	552,250*	<.0001
Resíduo	16	3,200	0,200		
Total	19	334,550			
	CV	19,03			

\*Significativo a 5% de probabilidade.