
CONTROLE BIOLÓGICO

Efeito de Produtos Fitossanitários Naturais Sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *in vitro*

NATALIA RAMOS MERTZ¹, LUÍS F. ANGELI ALVES², ANGELINA M MARCOMINI³, DAIAN G. PINTO DE OLIVEIRA³,
JULIANA C. DOS SANTOS⁴

¹Universidade Federal de Lavras – UFLA; Depto. de Entomologia, Lab. de Conservação de Inimigos Naturais, CP 3037, 37200-000, Lavras, MG, nataliamertz@bol.com.br;

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE; CCBS, Lab. de Zoologia de Invertebrados; Rua Universitária, 2069, CP 711, J. Universitário, 85814-110, Cascavel, lfaalves@unioeste.br;

³Universidade de São Paulo, ESALQ, Depto. de Entomologia e Acarologia, Av. Pádua Dias, 11, CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP, marcomin@esalq.usp.br; dgpdliv@esalq.usp.br;

⁴Universidade Federal de Viçosa, Depto. de Biologia Animal; Lab. de Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados, Rua Cristovão Longuinho Santana, 135, 36570-000, Viçosa, MG, ciencias_biologicas@hotmail.com

BioAssay 5:3 (2010)

Effect of Natural Phytosanitary Products on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *in vitro*

ABSTRACT – The associated use of natural products with entomopathogenic fungi can be an efficient strategy to pest and disease control and to reduce the environmental impacts, however, these products can act adversely against the fungi, affecting its vegetative growth, conidiogenesis, viability and pathogenicity. In view of the above, were evaluated the *in vitro* effects of the commercial products Agro-mos[®], Ecolife[®] and Dalneem[®] (concentrations 0.25; 0.5; 1; 2 and 4%) and the plant extracts of *Curcuma longa* (Zingiberaceae), *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon nardus* (Poaceae) (1; 5; 10; 15 e 20%) against *Beauveria bassiana*, which were mixed in a Potato Dextrose Agar (PDA) medium, into Petri dishes. Were verified the micelial growth, the conidiogenesis and the conidia viability, besides the fungi pathogenicity, when produced in contact with these products, against *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) caterpillars. The commercial products affected all the parameters, being toxic in all concentrations and the plant extracts reduced the viability in at least 50% when compared to the control. *Curcuma longa* was compatible to fungi in the 1% concentration, *Cymbopogon citratus* was compatible until 15% and *Cymbopogon nardus* until 10% and all of them did not affect the fungi virulency. The results prove the necessity of such studies in order to do not affect the action of biological control agents.

KEYWORDS – compatibility, entomopathogenic fungi, plant extracts, *Curcuma longa*, *Cymbopogon* spp.

RESUMO – A utilização conjunta de produtos de origem natural com fungos entomopatogênicos pode ser uma estratégia eficiente para o controle de pragas e doenças e reduzir danos ambientais. Contudo, estes produtos podem atuar negativamente sobre o fungo, afetando o seu crescimento vegetativo, produtividade e germinação de conídios, e até sua virulência. Com isso, foram avaliados *in vitro* os efeitos dos produtos comerciais Agro-mos[®], Ecolife[®] e Dalneem[®] (concentrações 0,25; 0,5; 1; 2 e 4%) e dos extratos das plantas cúrcuma (*Curcuma longa*) (Zingiberaceae), capim-limão (Poaceae) (*Cymbopogon citratus*) e citronela (*Cymbopogon nardus*) (1; 5; 10; 15 e 20%) sobre *Beauveria bassiana*, sendo os produtos e extratos adicionados ao meio Batata Dextrose Agar (BDA), em placas de Petri. Foram avaliados o crescimento vegetativo, produtividade e germinação de conídios e a virulência do fungo produzido em contato com os produtos, contra lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Os produtos comerciais afetaram todos os parâmetros, sendo tóxicos em todas as concentrações e os extratos de plantas reduziram a viabilidade em, no mínimo, 50% comparado à testemunha. A cúrcuma foi compatível ao fungo na menor concentração, sendo o capim limão compatível até 15% e a citronela até 10%, e ambos não afetaram a virulência do fungo. Os resultados comprovam a necessidade de estudos dessa natureza de forma a não comprometer a ação de agentes de controle biológico.

PALAVRAS-CHAVE – compatibilidade, fungo entomopatogênico, extratos vegetais, *Curcuma longa*, *Cymbopogon* spp.

No Brasil, o aumento da produtividade agrícola nos sistemas de cultivo convencional se deve, principalmente, a utilização de produtos agrotóxicos e fertilizantes químicos sintéticos. Porém, a intensiva utilização e a aplicação inadequada desses produtos vêm causando problemas ambientais, tais como a seleção de fitopatógenos, plantas invasoras e de insetos-praga resistentes (Keinath 1998, Diez-Rodríguez & Omoto 2001, Branco *et al.* 2003, Roman *et al.* 2004), além do empobrecimento do solo e danos à saúde dos produtores e consumidores. A ocorrência desses problemas e a crescente exigência do mercado por produtos “ambientalmente corretos” têm feito muitos agricultores adotarem alternativas naturais e menos nocivas ao meio ambiente para o controle de doenças e pragas (Agrianual 2001).

Dentre as alternativas para o controle de fungos fitopatogênicos, estão a utilização de extratos vegetais, como cúrcuma (*Curcuma longa* Linn.) (Zingiberaceae) (Saju *et al.* 1998, Singh & Rai 2000), capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.) (Fiori *et al.* 2000, Souza *et al.* 2002) e citronela (*C. nardus* Watson) (Poaceae) (Anthony *et al.* 2004). Além de produtos comerciais naturais compostos por extratos cítricos ou microrganismos, que podem ativar os mecanismos de defesa nas plantas tratadas ou possuir atividade antimicrobiana direta (Stangarlin *et al.* 1999, Cavalcanti *et al.* 2006, Santos *et al.* 2007).

Para o controle alternativo de insetos-praga, destacam-se as plantas da família Meliaceae, como o nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), cujo extrato possui ação inseticida comprovada sobre pragas como *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (Souza & Vendramin 2000), *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) (Trindade *et al.* 2000) e *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Prates *et al.* 2003).

Os fungos entomopatogênicos possuem também grande importância para o controle populacional de pragas, com destaque para *Beauveria bassiana* Bals. Vuil., o qual tem se mostrado eficiente para diversas pragas agrícola, como *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) (Vicentini *et al.* 2001), os ácaros *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Tamai *et al.* 1999) e *Oligonychus yothersi* McGregor (Acari: Tetranychidae) (Oliveira *et al.* 2002), *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) (Neves & Hirose 2005) e *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (Oliveira *et al.* 2008).

Todas estas alternativas não químicas para o controle de pragas e doenças têm papel importante no Manejo Integrado de Pragas (MIP). No entanto, os produtos fitossanitários naturais devem ser seletivos tanto aos fungos entomopatogênicos que ocorrem naturalmente, quanto aos que são introduzidos, a fim de conservar sua viabilidade para o controle de insetos (Hirose *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2003). Nesse sentido, os estudos acerca da compatibilidade entre produtos fitossanitários

e fungos entomopatogênicos passam a ser de grande importância em MIP (Silva & Neves 2005). Contudo, poucos estudos visam avaliar as alterações em diferentes variáveis de desenvolvimento de entomopatogênicos, causadas pela utilização conjunta destes com produtos naturais, mesmo esta sendo uma prática de interesse dos produtores que visam o controle eficiente das pragas e doenças com o mínimo impacto ambiental.

Assim, este trabalho teve por objetivo estudar, o efeito de produtos fitossanitários naturais, comerciais ou não, sobre o desenvolvimento do fungo entomopatogênico *B. bassiana* em condições de laboratório.

Material e Métodos

O fungo utilizado foi o isolado Unioeste 4 de *B. bassiana* (isolado de *Alphitobius diaperinus* Panzer, Coleoptera: Tenebrionidae), obtido no banco de patógenos do Laboratório de Zoologia de Invertebrados da UNIOESTE, cultivado pelo método de placa cheia em meio de esporulação (M.E.) e incubado por oito dias em câmara climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase) (Alves *et al.* 1998b). Após este período, o fungo foi recolhido e transferido para um tubo de vidro, onde se adicionaram 10 mL de água destilada estéril com espalhante adesivo Tween[®] 80 (0,01%) para que fosse realizada a quantificação em câmara de Neubauer e padronização da concentração de conídios (Alves & Moraes 1998).

Os tratamentos com as diferentes concentrações de produtos comerciais e extratos de plantas, utilizados como indutores de crescimento, inseticidas, fungicidas e/ou repelentes naturais estão expressos na Tabela 1.

Preparação dos meios de cultura. Os produtos comerciais foram adicionados em diferentes proporções (0,25; 0,5; 1; 2 e 4%) ao meio de cultura BDA (batata, ágar e dextrose) estéril não solidificado ($45-50^\circ\text{C}$), em frascos de vidro, sendo agitados para homogeneização dos componentes. Em seguida, adicionou-se o antibiótico sulfato de estreptomicina (0,1%) e então os meios foram vertidos nas placas de Petri. Cada tratamento constou de quatro repetições, contendo uma placa cada repetição.

As folhas das diferentes plantas foram trituradas juntamente com o caldo de batata, na quantidade em gramas necessária para se obter as diferentes concentrações (1; 5; 10; 15; e 20%). O líquido foi filtrado e a ele adicionaram-se a glicose e o ágar, que foram homogeneizados e, em seguida, esterilizados. Posteriormente, adicionou-se sulfato de estreptomicina (0,1%) e verteu-se o meio, como descrito anteriormente. Para a testemunha foram preparadas placas de Petri contendo apenas meio de cultura BDA.

Crescimento vegetativo e produção de conídios. Em todos os tratamentos realizou-se o mesmo procedimento, sendo inoculados, no centro de cada placa, 50 μL de suspensão contendo 5×10^7 conídios de *B. bassiana*.

Tabela 1. Nome, fabricante, local de fabricação, composição, princípio ativo, modo de ação, dose recomendada e concentração avaliada dos produtos comerciais e extrato bruto de plantas utilizadas nos tratamentos.

Produto	Nome	Fabricante/ Local	Composição/Princípio ativo	Ação/Dose recomendada	Concentração
Comercial	Agro-mos [®]	Improcrop/ Curitiba-Pr	Parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /Mananoligossacarídeo fosforilado	Indutor de resistência de plantas a diversas doenças/ 750 a 1000 mL 100 L ⁻¹	0,25; 0,5; 1; 2 e 4%
	Ecolife-40 [®]	Quinabra/São José dos Campos-Sp	Biomassa cítrica/Polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos	Revigorante para plantas, melhorando sua resistência natural contra doenças/ 200 mL 100 L ⁻¹	
	Dalneem [®]	Dalquim/ Itajai-Sc	Óleo emulsionável de sementes de <i>Azadirachta indica</i> /1500 a 1800 ppm de Azadirachtina	Inseticida das principais pragas do café, soja, algodão e citros/ 1000 mL 100 L ⁻¹	
Extrato vegetal	Cúrcuma	-	Rizoma de <i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	-	1; 5; 10; 15; e 20%
	Capim-limão	-	Folhas de <i>Cymbopogon citratus</i> (Poaceae)	-	
	Citronela	-	Folhas de <i>Cymbopogon nardus</i> (Poaceae)	-	

As placas foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase, por oito dias. Para a avaliação de crescimento vegetativo foram realizadas duas medições perpendiculares na área onde o fungo cresceu, obtendo-se o diâmetro médio das colônias dos tratamentos. Para a estimativa da produção de conídios, as colônias foram recortadas e cada uma foi transferida para um tubo de vidro contendo 10 mL de água destilada esterilizada com espalhante adesivo Tween[®] 80 (0,01%). Os conídios foram removidos por agitação durante 1 minuto. A suspensão obtida foi subsequentemente diluída e quantificada em câmara de Neubauer.

Os dados obtidos nas avaliações destes parâmetros foram submetidos ao cálculo compatibilidade, de acordo com a fórmula proposta por Alves *et al.* (1998a) para classificação do efeito de produtos químicos sobre fungos entomopatogênicos em testes *in vitro*, onde: $T = \frac{20(VG)+80(ESP)}{100}$, VG = crescimento vegetativo e ESP = esporulação. Para valores de T entre 0 e 30, a classificação é muito tóxico; entre 31 a 45, tóxico; 46 a 60, moderadamente tóxico e maiores que 60, compatível.

Germinação de conídios. O meio com os diferentes tratamentos foi vertido em placas de plástico de 9 cm de diâmetro e, depois do resfriamento e solidificação, foram espalhados 50 µL de suspensão fúngica contendo 5×10^7 conídios, pelo método de placa cheia. As placas foram incubadas por 16h a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase. Após este período, contou-se, dentre 500 conídios por placa, o número de conídios germinados e não-germinados, sob microscópio óptico (400×).

Teste de patogenicidade. Para este teste, utilizaram-se apenas os tratamentos que foram considerados compatíveis com o fungo pelo cálculo de compatibilidade. Conídios do fungo foram inoculados pelo método de placa cheia nas placas de Petri contendo o meio BDA com os tratamentos. Após oito dias de incubação (a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase), os conídios foram recolhidos e transferidos para tubos de vidro contendo 10 mL de água destilada esterilizada com espalhante adesivo Tween[®] 80 (0,01%). As suspensões obtidas foram homogeneizadas, diluídas, quantificadas em câmara de Neubauer, e padronizadas em concentrações de 1×10^8 conídios/mL.

Lagartas de 5^o instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) foram utilizadas como inseto-teste, colocadas em recipientes plásticos descartáveis onde foram imersas em 1 mL de suspensão de conídios, sendo agitadas manualmente por 30 segundos. Na testemunha, as lagartas foram imersas em solução aquosa de espalhante adesivo Tween[®] 80 (0,01%). Em seguida, os insetos foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro e dieta. As placas foram colocadas em recipientes plásticos contendo algodão umedecido, e estes mantidos em $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14h de fotofase. Cada tratamento consistiu de quatro repetições contendo 8 lagartas cada. As avaliações quanto à mortalidade foram realizadas diariamente, durante 12 dias, sendo que os insetos mortos foram imersos em solução de álcool 70%, e em seguida em água destilada, e transferidos para câmara úmida, a fim de permitir o desenvolvimento do fungo e assim, a confirmação do agente causador da mortalidade.

Análise estatística. Os dados foram transformados, quando necessário, e submetidos à análise de variância (teste F) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o programa Sisvar (Ferreira 1992). Para avaliação da correlação (ρ) foi utilizado o programa Microsoft Excel®.

Resultados e Discussão

Produtos comerciais. Observou-se redução em todas as variáveis avaliadas nos tratamentos com produtos comerciais, sendo que diferiram da respectiva testemunha. Além disso, observou-se, através da análise de correlação, que o efeito destes produtos sobre a atividade do fungo está inversamente relacionado à concentração dos produtos (Tabela 2).

Os produtos Agro-mos® e Ecolife® quando adicionados ao meio de cultura nas menores concentrações (0,25 e 0,5%) causaram reduções no crescimento vegetativo (Agro-mos®: $F = 970,52$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$; Ecolife®: $F = 439,52$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$), produção de conídios (Agro-mos®: $F = 275,05$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$; Ecolife®: $F = 277,01$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$) e germinação de conídios (Agro-mos®: $F = 143,18$; $gl = 5, 12$; $P < 0,05$; Ecolife®: $F = 130,62$; $gl = 5, 12$; $P < 0,05$), e nas maiores concentrações (1, 2 e 4%) ocasionaram inibição total do fungo (Tabela 2).

O efeito negativo de Agro-mos® provavelmente está associado à presença do cobre a 6% p/p em sua composição, o qual possui ação fungicida, uma vez que estudos realizados *in vitro* comprovaram que produtos fitossanitários à base de cobre foram muito tóxicos a *B. bassiana* (Tamai *et al.* 2002, Almeida *et al.* 2003).

O produto Ecolife® é composto por bioflavonóides, fitoalexinas cítricas, polifenóis e ácidos orgânicos. O efeito fungicida pode estar relacionado à ação das fitoalexinas, que são compostos antimicrobianos, sintetizados e armazenados nas plantas (Paxton 1981), cujo modo de ação sobre fungos envolve desorganização dos conteúdos citoplasmáticos, ruptura da membrana citoplasmática e inibição de enzimas fúngicas (Lo *et al.* 1996).

Outro fator a ser considerado é o pH muito baixo do Ecolife®, que na forma pura é 2,0 e quando misturado ao meio de cultura faz com que o pH deste passe de aproximadamente 7,0 para valores inferiores (5,6; 5,1; 4,8; 4,4 e 4, respectivamente, para as concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2 e 4% do produto). Considerando que o pH ótimo para o desenvolvimento de *B. bassiana* está entre 5,0 e 8,0 (Hallsworth & Magan 1996), provavelmente este fator possa ter contribuído para a diminuição no desenvolvimento do fungo, à medida em que se aumentavam as concentrações do produto.

Tabela 2. Médias do crescimento vegetativo, produção e germinação de conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) multiplicado em meio de cultura contendo produtos comerciais naturais, após 8 dias de incubação ($26 \pm 1^\circ$ C, fotofase de 12 horas).

Tratamento	Crescimento vegetativo (n=4)		Produção de conídios (n=4)		Germinação de conídios (n=4)	
	(cm ²)	(%) variação	($\times 10^5$)	(%) variação	(%)	(%) variação
Testemunha	4,3 \pm 0,20 a ¹	0,00	2672,0 \pm 299 a ¹	0,00	71,6 \pm 5,90 a ¹	0,00
Agro-mos 0,25%	1,4 \pm 0,01 b	-68,36	6,4 \pm 2,50 b	-99,76	34,6 \pm 2,42 b	-51,67
Agro-mos 0,5%	1,2 \pm 0,01 b	-73,21	1,3 \pm 0,21 b	-99,95	10,8 \pm 1,52 c	-84,89
Agro-mos 1%	0 c	-100,00	0 b	-100,00	1,3 \pm 0,47 d	-98,13
Agro-mos 2%	0 c	-100,00	0 b	-100,00	0,1 \pm 0,10 d	-99,86
Agro-mos 4%	0 c	-100,00	0 b	-100,00	0,1 \pm 0,09 d	-99,87
C.V. (%)	3,27	-	25,85	-	16,15	-
Testemunha	4,3 \pm 0,20 a	0,00	2672 \pm 299 a	0,00	71,6 \pm 5,90 a	0,00
Ecolife 0,25%	1,4 \pm 0,05 b	-68,13	779 \pm 50,47 b	-70,85	2,8 \pm 0,91 bc	-96,05
Ecolife 0,5%	0,3 \pm 0,48 c	-92,61	2,6 \pm 0,48 c	-99,90	9,2 \pm 1,47 b	-87,16
Ecolife 1%	0 d	-100,00	0 c	-100,00	0,6 \pm 0,33 cd	-99,08
Ecolife 2%	0 d	-100,00	0 c	-100,00	0 d	-100,00
Ecolife 4%	0 d	-100,00	0 c	-100,00	0 d	-100,00
C.V. (%)	5,18	-	18,48	-	22,14	-
Testemunha	3,8 \pm 0,07 a	0,00	3700,0 \pm 3,60 a	0,00	71,6 \pm 5,90 a	0,00
Dalneem 0,25%	3,0 \pm 0,07 b	-19,89	1935,0 \pm 1,90 b	-47,70	11,0 \pm 1,40 b	-84,65
Dalneem 0,5%	3,0 \pm 0,04 b	-20,16	934,0 \pm 0,90 c	-74,76	5,6 \pm 1,56 b	-92,24
Dalneem 1%	3,0 \pm 0,13 b	-20,42	455,0 \pm 0,30 d	-87,70	0,5 \pm 0,50 c	-99,30
Dalneem 2%	3,2 \pm 0,23 ab	-15,12	320,0 \pm 0,23 d	-91,35	0 c	-100,00
Dalneem 4%	2,3 \pm 0,12 c	-37,67	235,0 \pm 0,12 d	-93,65	0 c	-100,00
C.V. (%)	3,71	-	10,59	-	22,26	-

¹Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra na coluna, para cada produto, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Estudos semelhantes mostraram que o fungo *Colletotrichum lagenarium* Pass., causador da antracnose foi afetado em 70% do seu crescimento micelial, 96% da esporulação e 100% da germinação dos esporos pela presença de 0,5% de Ecolife® no meio de cultura (Motoyama et al. 2003).

Da mesma forma, observou-se o efeito deste produto sobre o crescimento micelial de *Phoma costarricensis* Ech. nas concentrações de 0,25 e 0,5%, e tal como aqui, ocorreu diminuição desta variável em 50 e 75%, respectivamente (Barguil et al. 2005).

Em relação aos dados obtidos com o fungo produzido com o produto Dalneem®, verificou-se que nas concentrações entre 0,25 e 2% foram obtidas colônias de mesmo tamanho, sendo em torno de 15 e 20%, menores que a testemunha, e na concentração 4%, o crescimento vegetativo foi 38% menor em relação ao controle ($F = 13,39$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). Quanto à produção de conídios, houve redução gradativa entre os tratamentos, variando de 47% na menor a 93% na maior concentração, quando comparada à testemunha ($F = 102,89$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). A germinação foi consideravelmente afetada pelo produto, havendo conídios viáveis apenas nas duas menores concentrações (0,25 e 0,5%), com redução de 85 e 92%, em relação à testemunha ($F = 120,90$; $gl = 5, 12$; $P < 0,05$).

Quando adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 2 e 4%, o produto Dalneem® permitiu crescimento de colônia, mas não a germinação de conídios. Esse fato pode estar relacionado ao efeito fungistático do produto, o qual retardou a germinação dos conídios.

Hirose et al. (2001), utilizando 2% de óleo de sementes de nim e *B. bassiana*, mostraram redução de 36,6% do crescimento vegetativo, 84,9% na produção de conídios e 25% de redução na germinação dos conídios. Da mesma forma, Marques et al. (2004) observaram que o produto NIM-I-GO® (à base de o óleo de sementes de

nim), em concentrações de 0,32 e 5%, inibiu a produção de conídios de *B. bassiana* em 88,6 e 96,6%, respectivamente, porém, ao contrário do observado, nenhuma das concentrações avaliadas afetou a germinação dos conídios.

Os resultados apresentados por estes autores quanto ao crescimento vegetativo e produção de conídios foram semelhantes aos obtidos neste trabalho, porém houve grande divergência quanto à germinação dos conídios, sendo que tais autores observaram pouca influência dos produtos sobre a germinação e no presente trabalho a germinação foi muito afetada. Talvez esta divergência se deva às variações nos teores de azadirachtina nos diferentes produtos, sendo que ela possui ação fungitóxica (Sidhu et al. 2004) e não ocorre esta padronização nas formulações à base de nim (Brito et al. 2006).

Outro fator que pode influenciar diferenças entre os trabalhos que visam estudar os efeitos dos produtos sobre fungos é falta de padronização na metodologia para a realização de testes de compatibilidade (Silva & Neves 2005).

Neste sentido, pode-se citar a divergência dos resultados obtidos neste trabalho com os obtidos por Dipieri et al. (2005), os quais constataram que o produto Dalneem®, nas concentrações 0,5 e 1%, reduziu em 49,8 e 53,1%, respectivamente o crescimento vegetativo do fungo, 49,8 e 66,3% a produção de conídios e não afetou a germinação. Esta discordância entre os resultados provavelmente ocorreu devido as diferentes metodologias adotadas para a realização dos testes. Para a inoculação do fungo nos meios de cultura contendo os tratamentos (para a avaliação de crescimento vegetativo e produção de conídios) os autores o fizeram por meio de micélios em discos de BDA, e para a avaliação da germinação dos conídios foram utilizadas lâminas microscópicas que continham uma camada de BDA e conídios, incubadas por 20 horas.

Tabela 3. Toxicidade (T) e classificação dos produtos comerciais quanto à compatibilidade a *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4).

Tratamento	Valor de T	Classificação ¹
Agro-mos 0,25%	6,52 ¹	Muito Tóxico
Agro-mos 0,5%	5,40	Muito Tóxico
Agro-mos 1%	0	Muito Tóxico
Agro-mos 2%	0	Muito Tóxico
Agro-mos 4%	0	Muito Tóxico
Ecolife 0,25%	29,70	Muito Tóxico
Ecolife 0,5%	1,56	Muito Tóxico
Ecolife 1%	0	Muito Tóxico
Ecolife 2%	0	Muito Tóxico
Ecolife 4%	0	Muito Tóxico
Dalneem 0,25%	57,86	Moderadamente Tóxico
Dalneem 0,5%	36,16	Tóxico
Dalneem 1%	25,75	Muito Tóxico
Dalneem 2%	23,90	Muito Tóxico
Dalneem 4%	17,55	Muito Tóxico

¹ Valores de T, segundo Alves et al. (1998a): entre 0 e 30 = muito tóxico; entre 31 e 45 = tóxico; entre 46 e 60 = moderadamente tóxico; maiores que 61 = compatível.

Verificou-se também que nenhum dos produtos comerciais foi considerado compatível quanto à toxicidade a *B. bassiana* (Tabela 3).

Os produtos Agro-mos® e Ecolife® foram classificados como muito tóxicos ao entomopatôgeno, enquanto Dalneem®, nas concentrações 0,25 e 0,5%, foi classificado como moderadamente tóxico e tóxico, respectivamente, e nas concentrações mais elevadas, muito tóxico.

Porém, deve-se levar em consideração que os experimentos foram conduzidos expondo ao máximo o fungo à ação dos produtos, situação esta que não acontece em condições de campo, de forma que a alta toxicidade *in vitro* pode não se repetir no campo, mas mostra a possibilidade de ocorrência, sendo necessário realizar ensaios em tais condições (Alves *et al.* 1998a, Neves *et al.* 2001).

Extratos não comerciais. Os extratos de cúrcuma, citronela e capim-limão, causaram redução em algumas das variáveis avaliadas de *B. bassiana*, porém, nenhuma das plantas inibiu totalmente o fungo, mesmo nas maiores concentrações (Tabela 4).

O extrato de cúrcuma na concentração 1% inibiu o crescimento vegetativo em 19,6%, comparado à testemunha, não ocorrendo maiores alterações no tamanho de colônia ao se aumentar as quantidades do extrato, chegando ao máximo de 33% de inibição no tratamento 20% ($F = 22,67$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). A produção de conídios não foi afetada com a concentração 1%, porém, nas demais foi consideravelmente reduzida, chegando a 90% de inibição no tratamento 20% ($F = 100,76$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). A germinação dos conídios foi a variável mais afetada, observando-se diminuição de 50% na concentração mais baixa da planta e 90% na maior, se comparado com o controle ($F = 82,08$; $gl = 5, 12$; $P < 0,05$).

A cúrcuma possui ação comprovada contra vários fungos fitopatogênicos (Saju *et al.* 1998, Singh *et al.* 2002), que são consideravelmente afetados em algumas variáveis, como o crescimento vegetativo, sendo os efeitos mais severos em relação aos observados no presente trabalho. Ressalta-se, porém, que desconhecem-se relatos sobre o efeito desta planta sobre fungos entomopatogênicos.

Tabela 4. Médias do crescimento vegetativo, produção e germinação de conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) multiplicado em meio de cultura contendo extratos brutos de plantas, após 8 dias de incubação (26±1° C, fotofase de 12 horas).

Tratamento	Crescimento vegetativo (n=4)		Produção de Conídios (n=4)		Germinação de conídios (n=4)	
	(cm ²)	(%) variação	(× 10 ⁶)	(%) variação	(%)	(%) variação
Testemunha	3,8 ± 0,07 a ¹	0,0	370,0 ± 3,60 a ¹	0,0	72,6 ± 3,20 a ¹	0,0
Cúrcuma 1%	3,0 ± 0,05 b	-19,6	337,7 ± 1,60 a	-8,7	34,4 ± 1,90 b	-52,6
Cúrcuma 5%	2,8 ± 0,06 bc	-25,5	179,2 ± 1,70 b	-51,6	23,1 ± 0,50 c	-68,2
Cúrcuma 10%	2,8 ± 0,05 bc	-25,2	77,8 ± 0,70 c	-79,0	19,2 ± 1,40 c	-73,6
Cúrcuma 15%	2,6 ± 0,09 c	-31,6	50,4 ± 0,48 cd	-86,4	22,0 ± 2,60 c	-69,7
Cúrcuma 20%	2,5 ± 0,15 c	-33,4	36,7 ± 0,45 d	-90,1	7,60 ± 1,90 d	-89,5
C.V. (%)	2,73	-	9,04	-	8,60	-
Testemunha	3,5 ± 0,01 a	0,0	213,7 ± 38,42 a	0,0	72,6 ± 3,20 a	0,0
Capim-limão 1%	2,8 ± 0,06 b	-20,7	215,5 ± 17,44 a	0,8	24,6 ± 1,25 b	-66,1
Capim-limão 5%	2,6 ± 0,05 bc	-27,5	200,2 ± 22,95 a	-6,3	17,2 ± 1,82 b d	-76,3
Capim-limão 10%	2,6 ± 0,09 bc	-26,3	164,7 ± 10,11 a	-22,9	11,2 ± 0,92 cd	-84,6
Capim-limão 15%	2,4 ± 0,05 cd	-30,6	173,5 ± 49,40 a	-18,8	9,0 ± 3,02 cd	-87,6
Capim-limão 20%	2,2 ± 0,07 d	-37,4	13,4 ± 2,96 b	-93,8	3,4 ± 0,77 d	-95,3
C.V. (%)	2,16	-	10,46	-	6,35	-
Testemunha	3,5 ± 0,01 a	0,0	213,7 ± 38,42 bc	0,0	72,6 ± 3,20 a	0,0
Citronela 1%	2,6 ± 0,08 b	-25,8	304,7 ± 8,53 a	42,6	34,2 ± 0,46 b	-52,9
Citronela 5%	3,2 ± 0,09 a	-8,8	240,7 ± 14,22 ab	12,6	18,2 ± 1,40 c	-74,9
Citronela 10%	2,7 ± 0,07 b	-22,7	164,7 ± 10,87 c	-22,9	15,7 ± 0,75 c	-78,4
Citronela 15%	2,3 ± 0,05 c	-34,8	24,5 ± 0,95 d	-88,5	16,5 ± 1,42 c	-77,3
Citronela 20%	1,6 ± 0,05 d	-53,3	2,7 ± 0,53 e	-98,7	14,7 ± 1,08 c	-79,8
C.V. (%)	2,12	-	17,84	-	14,59	-

¹ Médias (± EP) seguidas da mesma letra na coluna, para cada produto, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Contudo, estudos realizados mostraram que 10% do rizoma em meio de cultura provoca a redução de 70% do crescimento vegetativo do fungo *Helminthosporium oryzae* Breda de Hann, bem como 1% de extrato inibe 61% do crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* Schltdl. e *Rhizoctonia solani* Kuhn, sendo todos fungos fitopatogênicos pertencentes à mesma classe que *B. bassiana*, Hyphomycetes, o que, de certa forma, pode corroborar com os resultados aqui obtidos (Harish et al. 2004, Amaral & Bara 2005).

Quanto ao capim-limão, sua ação reduziu em 20 e 37% o crescimento vegetativo nas concentrações 1 e 20%, respectivamente, se comparada à testemunha ($F = 42,99$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). O extrato da planta, nas concentrações entre 1 a 15%, não afetou a produção de conídios, ocorrendo diminuição apenas na maior concentração (93% de redução) ($F = 15,29$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). Em relação à viabilidade, verificou-se na concentração de 1% uma redução de 66% em relação à testemunha, sendo que entre nos tratamento 5 e 20% a germinação foi reduzida em 76 e 95%, respectivamente, em comparação ao controle ($F = 60,05$; $gl = 5, 12$; $P < 0,05$).

Os estudos relacionados às atividades de capim-limão revelam atividade bactericida (Cimanga et al. 2002, Ordóñez et al. 2004), repelente a insetos (Oyedele et al. 2002), inseticida (Cavalcanti et al. 2004) e fungicida para fungos fitopatogênicos (Paranagama et al. 2003, Herath & Abeywickrama 2008), sendo que na maioria utilizou-se o óleo essencial da planta para a realização dos testes, e assim como a cúrcuma, são escassos os estudos sobre a atividade da planta sobre fungos entomopatogênicos.

Porém, ao comparar os resultados obtidos por Fiori et al. (2000) ao avaliar os efeitos de extrato bruto de capim-limão sobre o fungo *Didymella bryoniae* Auersw. Rehm, causador de doenças em cultivo de melão, observou-se que este patógeno é menos suscetível ao extrato de capim-limão que *B. bassiana*, já que a concentração 20% inibiu apenas 31% a produção de conídios do fitopatógeno, apesar de ambos pertencerem ao mesmo grupo Deuteromycota.

Em relação à citronela, houve redução de 25,8% no crescimento vegetativo no meio contendo 1% e 10% do seu extrato, em relação à testemunha. Contudo, a diferença não foi verificada na concentração de 5%. Nas outras concentrações, o crescimento foi afetado, com redução de 23 a 53% em relação à testemunha ($F = 101,07$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). A produção de conídios aumentou 42% no tratamento 1%, em relação ao controle, além disso, as concentrações 5 e 10% não inibiram a produção de conídios, havendo efeito negativo somente nas concentrações 15 e 20% ($F = 116,18$; $gl = 5, 18$; $P < 0,05$). Quanto à germinação, no tratamento 1% houve uma queda de 52% comparando-se ao controle, mas não houve diferença significativa entre

as demais concentrações, já que a redução permaneceu em torno de 75% ($F = 148,32$; $gl = 5, 12$; $P < 0,05$).

O aumento da produção de conídios quando adicionado o extrato bruto da citronela na concentração 1% pode ter ocorrido pelo aproveitamento de algum componente da planta, que em determinada quantidade pode ser metabolizado como nutriente pelo fungo, conforme observaram Tamai et al. (2002), testando *in vitro* o efeito de alguns produtos fitossanitários sintéticos sobre *B. bassiana*.

Além disso, Billerbeck et al. (2001) constataram que o óleo essencial de citronela é capaz de interferir a função das enzimas responsáveis por sintetizar células estruturais do fungo *Aspergillus niger* V. Tieg. (pertencente ao mesmo grupo Deuteromycota de *B. bassiana*), o que ocasionou distúrbios no seu crescimento. No entanto, pouco se sabe sobre o seu efeito sobre organismos não-alvo, como os fungos entomopatogênicos.

Observou-se também, que todos os extratos, nas menores concentrações foram compatíveis ao fungo, contudo, todos foram muito tóxicos ao fungo na maior concentração (Tabela 5).

O estímulo na produção de conídios pela citronela nas duas menores concentrações, e a atribuição de 80% do valor da fórmula para esta variável, resultaram em valores de T acima de 100, explicando assim a compatibilidade com o fungo.

Tal como mencionado para os produtos comerciais, a ocorrência de compatibilidade em experimentos *in vitro*, nos quais extratos de planta e fungo foram expostos ao máximo de contato, garantem a mesma relação em campo, onde o contato entre eles é menor. Por outro lado, a incompatibilidade *in vitro* pode não se repetir em condições de campo (Alves et al. 1998a).

Ao se comparar os efeitos dos produtos e das plantas sobre *B. bassiana* pelo cálculo de toxicidade, nota-se que, de modo geral, as plantas foram menos tóxicas ao fungo que os produtos comerciais, já que estes não apresentaram compatibilidade. Possivelmente este fato tenha ocorrido devido à maior concentração de diferentes princípios ativos ou presença de certos ingredientes das formulações comerciais, como estabilizantes e emulsificantes, que podem afetar o entomopatógeno (Batista et al. 1998).

Neste sentido, estudos comprovaram que quantidades iguais de diferentes formulações de sementes de nim diferem quanto à compatibilidade a *B. bassiana* (Dipieri et al. 2005). Em outro trabalho, Tamai et al. (2002) observaram que inseticidas sintéticos de diferentes fabricantes, com a mesma composição de ingredientes ativos, levaram a diferença na toxicidade para *B. bassiana*, fato que, segundo os autores, não se deve à concentração do princípio ativo, mas sim a outros constituintes de cada formulação.

Outra questão que deve ser considerada é o fato da fórmula de toxicidade não levar em conta a germinação,

Tabela 5. Toxicidade (T) e classificação das plantas quanto à compatibilidade a *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 04).

Tratamento	Valor de T ¹	Classificação ¹
Cúrcuma 1%	89,09	Compatível
Cúrcuma 5%	53,65	Moderadamente Tóxico
Cúrcuma 10%	31,78	Tóxico
Cúrcuma 15%	24,58	Muito Tóxico
Cúrcuma 20%	21,25	Muito Tóxico
Capim-limão 1%	96,52	Compatível
Capim-limão 5%	89,45	Compatível
Capim-limão 10%	76,39	Compatível
Capim-limão 15%	78,82	Compatível
Capim-limão 20%	15,54	Muito Tóxico
Citronela 1%	128,90	Compatível
Citronela 5%	108,35	Compatível
Citronela 10%	77,13	Compatível
Citronela 15%	22,22	Muito Tóxico
Citronela 20%	10,36	Muito Tóxico

¹ Valores de T, segundo Alves *et al.* (1998a): entre 0 e 30 = muito tóxico; entre 31 e 45 = tóxico; entre 46 e 60 = moderadamente tóxico; maiores que 61 = compatível.

atribuindo valores apenas para a produção de conídios e crescimento vegetativo. Apesar de o crescimento vegetativo ser importante para a colonização do hospedeiro e a produção de conídios ser responsável pela transmissão vertical do fungo (Alves *et al.* 1998a), a germinação deve ser igualmente considerada, já que havendo inibição da germinação dos conídios (como no caso dos produtos comerciais), conclui-se que o fungo afetado não irá penetrar no inseto, não ocorrendo o desenvolvimento da doença, o que evidencia a necessidade de revisão do cálculo para que passe a levar em consideração tal variável.

Em relação ao teste de patogenicidade, constatou-se que os tratamentos considerados compatíveis à *B. bassiana* não afetaram a atividade do fungo ($F = 18,23$; $gl = 9, 30$; $P < 0,05$) (Tabela 6).

Observou-se que os tratamentos compatíveis causaram pequena redução no crescimento vegetativo do fungo, sem afetar a produção de conídios e a atividade inseticida, havendo ainda estímulo para a primeira, nos tratamentos com citronela 1 e 5%. Tais extratos de plantas, quando em contato máximo com o fungo, apresentaram em laboratório um efeito desejável em campo, a maximização da sua conidiogênese, sem redução da sua eficiência no controle de insetos.

Com isso, mais estudos devem ser realizados relacionando os extratos de plantas e *B. bassiana*, principalmente com os de citronela, a fim de garantir se estes causam os mesmos efeitos observados em diferentes condições de contato com o fungo. Além disso, deve-se levar em consideração a importância da realização de experimentos que reproduzam ao máximo as condições de campo, pois só desta forma é que se pode observar o real efeito dos produtos ou plantas sobre os inimigos naturais.

Tabela 6. Porcentagem de mortalidade média confirmada de lagartas de *G. mellonella*, tratadas com conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 04), produzidos em meios BDA contendo os diferentes tratamentos, 12 dias após a inoculação ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase).

Tratamento	Mortalidade (%) (n=4)
Testemunha água	0,0 ± 0,00 a
Testemunha fungo	56,3 ± 16,14 b
Cúrcuma 1%	56,3 ± 16,14 b
Citronela 1%	65,7 ± 18,75 b
Citronela 5%	65,7 ± 11,97 b
Citronela 10%	56,3 ± 12,50 b
Capim-limão 1%	53,1 ± 21,35 b
Capim-limão 5%	62,5 ± 17,68 b
Capim-limão 10%	62,5 ± 17,68 b
Capim-limão 15%	56,3 ± 23,94 b
C.V. (%)	16,59

¹ Médias (± EP) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Agradecimentos

Aos professores da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, José R. Stangarlin pelo material e metodologia cedidos, e Fabiana G. S. Pinto pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Literatura Citada

Agriannual. 2001. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, FNP Consultoria & Comercio. 545p.

- Almeida, J.E.M., A. Batista Filho, C. Lamas, L.G. Leite, M. Trama & A.H. Sano. 2003. Avaliação da compatibilidade de defensivos agrícolas na conservação de microorganismos entomopatogênicos no manejo de pragas do cafeeiro. *Arq. Inst. Biol.* 70: 79-84.
- Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998a. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, p.217-238. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998b. Técnicas de laboratório, p.637-711. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B. & S.A. Moraes. 1998. Quantificação de inóculos de patógenos de insetos, p.765-777. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Fealq, 1163p.
- Amaral, M.F.Z.J. & M.T.F. Bara. 2005. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*. 2: 5-8.
- Anthony, S., K. Abeywickrama, R. Dayananda, S.W. Wijeratnam & L. Arambewala. 2004. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. *Mycopathologia*. 157: 91-97.
- Barguil, B.M., J.E.A. Beserra Jr., M.L.V. Resende, R.S. Resende & S.M.L. Salgado. 2005. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. *Fitopatol. Bras.* 30: 535-537.
- Batista, A.F., S.B. Alves, A.F.A. Alves, R.M. Pereira & N.T. Augusto. 1998. Formulação de entomopatogênicos, p. 917-965. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Fealq, 1163p.
- Billerbeck, V.G., J.M. Bessière, R. Dargent, J.L. Fonville & C.G. Roques. 2001. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 47: 9-17.
- Branco, C.M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.* 21: 549-552.
- Brito, H.M., M.G.C. Gondim Jr, J.V. Oliveira & C.A.G. Câmara. 2006. Toxicidade de formulações de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao ácaro-rajado e a *Euseius alatus* De Leon e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 500-505.
- Cavalcanti, E.S.B., S.M. Morais, M.A.A. Lima & E.W.P. Santana. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 541-544.
- Cavalcanti, F.R., M.L.V. Resende, A.B. Zacaroni, P.M.R. Júnior, J.C.B. Costa & R.M. Souza. 2006. Acibenzolar-s-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatol. Bras.* 31: 372:380.
- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. Bruyne, N. Hermans, J. Totte, L. Pieters & A.J. Vlietinck. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79: 213-220.
- Diez-Rodríguez, G.I. & C. Omoto. 2001. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. *Neotrop. Entomol.* 30: 311-316.
- Dipieri, R.A., S.S. Martinez & A.O. Menezes Jr. 2005. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. *Neotrop. Entomol.* 34: 601-606.
- Ferreira, D.F. 1992. SISVAR (Sistema para análise de variância para dados balanceados). Lavras, UFLA, 79p.
- Fiori, A.C.G., K.R.F. Schwan-Estrada, J.R. Stangarlin & J.B. Vida, C.A. Scapim, M.E.S. Cruz & S.F. Pascholati. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathol.* 148: 483-487.
- Hallsworth, J.E. & N. Magan. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2435-2442.
- Harish, S., E.G. Ebenezar, R. Radjaccomare, T. Saravanan & K. Seetharaman. 2004. Mycotoxic effect of seed extract against *Helminthosporium oryzae* Breda de Hann, the incitant of rice brown spot. *J. Biol. Sci.* 4: 366-369.
- Herath, H. & K. Abeywickrama. 2008. In vitro application of selected essential oils and their major components in controlling fungal pathogens of crown rot in Embul banana (*Musa acuminata* - AAB). *Int. J. Food Sci. Technol.* 43:440-447.
- Hirose, E., L.H. Martins, A. Moino JR., P.M.O.J. Neves, C.H. Peralta & J.A.C. Zequi. 2001. Effect of biofertilizers and Neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 44: 409-423.
- Keinath, A.P. 1998. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. *Plant Dis.* 82: 479-484.
- Lo, L.C., I. Weiergang, C. Bonham, J. Hipskind, K. Wood & R.L. Nicholson. 1996. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl

- ether luteolinidin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 21-31.
- Marques, R.P., A.C. Monteiro & G.T. Pereira. 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*. 34:1675-1680.
- Motoyama, M.M., A.C.G. Fiori, C.A. Scapim, K.R.F. Schwan-Estrada & J.R. Stangarlin. 2003. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Acta Sci. Agron.* 25: 509-512.
- Neves, P.M.O.J. & E. Hirose. 2005. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 77-82.
- Neves, P.M.O.J., E. Hirose, A. Moino Jr. & P.T. Tchujo. 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotrop. Entomol.* 30: 263-268.
- Oliveira, R.C., L.F.A. Alves & P.M.O.J. Neves. 2002. Susceptibilidade de *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) ao fungo *Beauveria bassiana*. *Sci. Agric.* 59: 187-189.
- Oliveira, C.N., P.M.O.J. Neves & L.S. Kawazoe. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Sci. Agric.* 60: 663-667.
- Oliveira, M.A.P., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira & R. Barros. 2008. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Sci. Biol. Sci.* 30: 220-224.
- Ordóñez, M.G., M.R. Jorge, G.G. Simón & C.L. Rangel. 2004. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Rev. Cuba. Plantas Med.* 9:0-0.
- Oyedele, A.O., A. A. Gbolade, M. B. Sosan, F. B. Adewoyin, O. L. Soyelu & O. O. Orafidiya. 2002. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from Lemongrass oil. *Phytomedicine.* 9: 259-262.
- Paranagama, P.A., K.H.T. Abeysekera, K. Abeywickrama & L. Nugaliyadde. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 86-90
- Paxton, J. D. 1981. Phytoalexins - a working redefinition. *Phytopathology.* 101:106-109.
- Prates, H.T., P.A. Viana & J.M. Waquil. 2003. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:437-439.
- Roman, E.S, L. Vargas, M.A. Rizzardí & R.W. Mattei. 2004. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida Glyphosate. *Planta Daninha.* 22: 301-306.
- Saju, K.A., M.N. Venugopal & M.J. Mathew. 1998. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Curr. Sci.* 75: 660-662.
- Santos, F.S., P.E. Souza, M.L.V. Resende, E.A. Pozza, J.C. Miranda, P.M.R. Júnior & F.C. Manerba. 2007. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. *Fitopatol. Bras.* 32: 59-63.
- Sidhu, O.P., V. Kumar & H.M. Behl. 2004. Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. *Ind. Crops Prod.* 19: 69-75
- Silva, R.Z. & P.M.O.J. Neves. 2005. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *in vitro* phytosanitary products. *Pest Manag. Sci.* 61: 667-674.
- Singh, G., O.P. Singh & S. Maurya. 2002. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Progress Crystal Growth Characterization of Materials.* 45: 75-81.
- Singh, R. & B. Rai. 2000. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. *Microbios.* 102: 165-173.
- Souza, A.P. & J.D. Vendramin. 2000. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. *Bragantia.* 59:173-179.
- Souza, M.A.A., R.S.O.S. Borges, M.L.M. Stark & S.R. Souza. 2002. Efeito de extratos aquosos, metanólicos e etanólicos sobre a germinação de sementes de alface sobre o desenvolvimento micelial de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. *Revista Universidade Rural.* 22: 181-185.
- Stangarlin, J.R., M.E.S. Cruz, M.H. Nozaki & K.R.F. Schwan-Estrada. 1999. Plantas medicinais. *Biocologia: Ciência e Desenvolvimento.* 11: 16-24.
- Tamai, M.A., S.B. Alves & P.J. Neves. 1999. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ao ácaro *Tetranychus urticae* Koch. *Sci. Agric.* 56: 285-288.
- Tamai, M.A., S.B. Alves, M. Faion, R.B. Lopes & L.F.L. Padulla. 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana*. *Arq. Inst. Biol.* 69: 89-96.
- Trindade, R.C.P., I.M.R. Marques, H.S. Xavier & J.V. Oliveira. 2000. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. *Sci. Agric.* 57: 407-413.
- Vicentini, S., M. Faria & M.R.V. Oliveira. 2001. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. *Neotrop. Entomol.* 30: 97-103.